

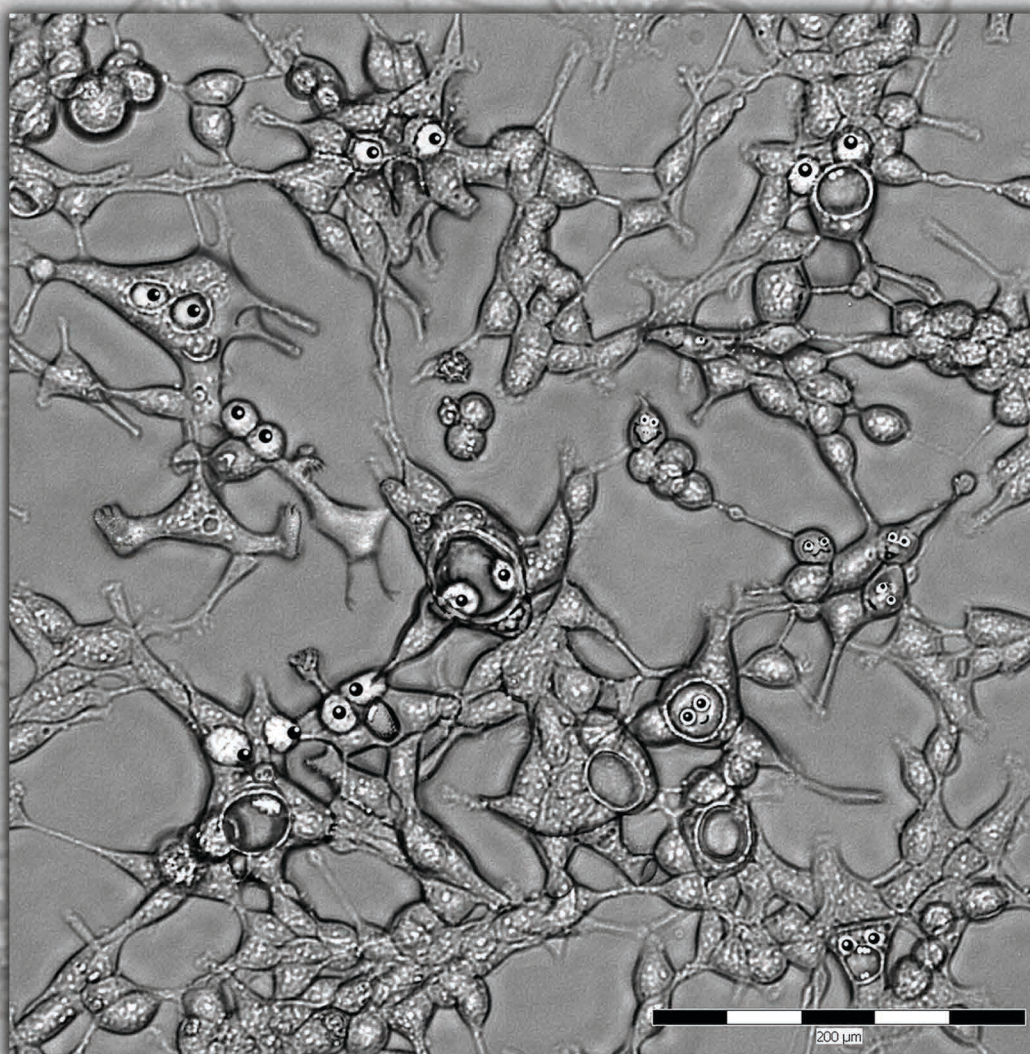


UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSEŇIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE
Ústav lekárskej biochémie



Z laboratória do klinickej praxe II

„Molekulové mechanizmy pri rozvoji malígnych chorôb a metódy ich detekcie“



Martin 2018

„Tento zborník prác vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja



„Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ“

Z laboratória do klinickej praxe II

(Molekulové mechanizmy pri rozvoji malígnych chorôb a metódy ich detekcie)

Recenzovaný zborník prác - neperiodická publikácia

Zostavovatelia: doc. RNDr. Jozef HATOK, PhD.
prof. RNDr. Peter RAČAY, PhD.

Recenzenti: doc. RNDr. Ľudovít MUŠÁK, PhD.
doc. RNDr. Miroslava RABAJDOVÁ, PhD.

Zborník neprešiel jazykovou korektúrou

Za obsahovú a gramatickú stránku zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov

Miesto a rok vydania: Martin, 2018

Počet strán: 114

Dostupnosť on-line: https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-lekarskej-biochemie/VEDA/ZBORNIK_Dg.Algoritmus_2018.pdf

Autori príspevkov ďakujú dr. Ivane Pilchovej za poskytnutie ilustrácie a vyhotovenie titulnej strany zborníka.

ISBN 978-80-8187-054-5

EAN 9788081870545

Obsah

Súčasný molekulový poznatky determinujúce glioblastómy (S. Baroniaková)	4
Nádorová terapia cielená na inhibíciu mitochondriálnych funkcií (A. Evinová)	12
Proteomické profilovanie a jeho využitie v diagnostike endometriálneho karcinómu (V. Fialková)	18
Úloha TET enzýmov pri nádorových ochoreniach (E. Gondáš)	25
Regulácia významných apoptotických dráh pri spúšťaní nádorových procesov (J. Hatok)	30
Neinvazívne <i>in-vivo</i> mapovanie MR-parametrov pri diagnostike intrakraniálnych nádorov (P. Hnilicová)	38
Nové strategické prístupy v liečbe glioblastómu (Z. Majerčíková)	43
Úloha vitamínu C v prevencii a liečbe nádorových ochorení (R. Murín)	52
Deregulácia bielkovín Bcl-2 rodiny u malígnych ochorení (P. Račay)	57
Etiológia, patogenéza a liečba nádorov mozgu (P. Račay)	63
Nové ciele liečby malígnych ochorení (P. Račay)	69
Súčasný a budúci liečby malígnych ochorení cielené na charakteristické črty malígnych buniek (P. Račay)	73
Prehľad vybraných molekulárných prognostických biomarkerov glioblastoma multiforme (M. Slašťan)	79
Prehľad vybraných prognostických biomarkerov zobrazovacích vyšetrení u glioblastoma multiforme (M. Slašťan)	84
Kontrola kvality mitochondrií v onkológii (Z. Tatarková)	89
Porovnanie dostupných metód na odstránenie albumínu zo vzoriek krvného séra (A. Tomašcová) ...	95
Génová analýza mikroprostredia pri karcinóme prsníka (A. Vážanová)	101
Signálne dráhy prežívania v spojitosti s nádorovými ochoreniami mozgu (A. Vážanová)	108

SÚČASNÉ MOLEKULOVÉ POZNATKY DETERMINUJÚCE GLIOBLASTÓMY

S. Baroniaková¹, E. Vidomanová², R. Richterová³, P. Račay² a J. Hatok¹

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)

²Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine

³Neurochirurgická klinika, JLF UK v Martine a Univerzitná nemocnica Martin

Korešpondujúca osoba:

doc. RNDr. Jozef Hatok, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Ústav lekárskej biochémie

Malá Hora 4D - 036 01 Martin – SK

E-mail: hatok@jfm.uniba.sk

Kľúčové slová: glioblastóm, onkogenéza, molekulová klasifikácia, signálne dráhy

Abstrakt

Multiformný glioblastóm predstavuje smrteľne rizikovú chorobu, ktorú aj napriek pokrokom vývoja nových diagnostických inovácií a cielených terapií nie sme schopní úplne vyliečiť, resp. zvyšovať percento úspešnosti. Tento pochmúrny výsledok je väčšinou spájaný s komplexnosťou choroby, ako je individuálna heterogenita a výskyt niekoľko násobných genetických nestabilití. Pochopenie molekulovej podstaty glioblastómov môže zlepšiť skorú diagnostiku, prognózu a terapeutickú predpoveď. Navyše, súčasné technologické vymoženosti na úrovni genomiky, epigenetiky, transkriptomiky či proteomiky pomáhajú k definovaniu prognostických a prediktívnych markerov. Na niektorých biomarkerov už bola dokonca realizovaná laboratórna validácia a sú použiteľné pre klinickú aplikáciu. V tomto príspevku diskutujeme o signalizačných molekulách glioblastómového procesu a súčasných výhodách molekulových analýz s možnosťou využitia v personalizovanom medicínskom prístupe.

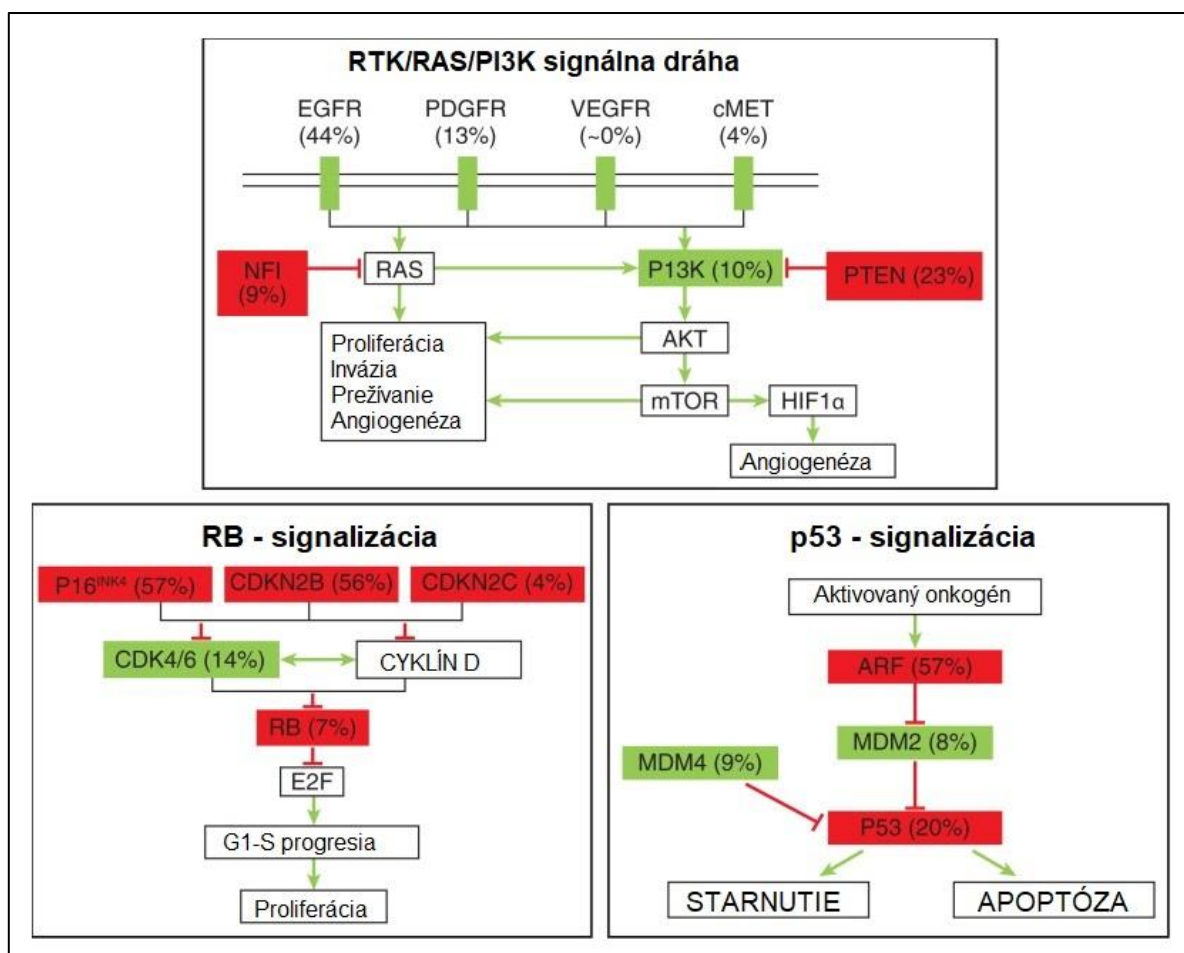
Úvod

Glioblastóm (GBM) je najfrekvencovanejším typom primárnych nádorov centrálneho nervového systému u dospelého človeka. Dostatočná prognóza nádoru tohto typu ani napriek rozvoju inovatívnych diagnostických stratégií a nových terapií však výraznejšie nepokročila. Komplexná a náročne reprodukovateľná diagnóza spolu s neschopnosťou určiť presnejšiu odpoveď na citlivosť voči chemoterapeutickým režimom, ako aj neoptimálna biologická dostupnosť CNS, prispievajú k nedostačujúcej prognóze pacientov s glioblastómom [1]. Preto pochopenie molekulárnych mechanizmov podložených na pozadí agresívneho správania GBM buniek môže viesť k personalizovanému prístupu, adekvátnejším terapiám a lepšie dosiahnuteľným výsledkom. Samotná progresia nádorového ochorenia je podporovaná somatickou evolúciou, čo je proces hromadenia mutácií, ktorý spôsobuje odchýlku genómu nádorovej bunky od zdravej bunky. Niektoré druhy malignít, napríklad karcinóm hrubého čreva majú špecifické a konkrétne definované zmeny, ktoré predchádzajú jeho vývoju. Pre vývoj glioblastómu je špecifický výskyt rozdielnych genetických a molekulových aberácií v rámci hlavných signalizačných dráh. V ostatných rokoch sa však rozšírili opodstatnené informácie, dokazujúce, že nádory sa vytvárajú z rôznorodých zoskupení malígnych buniek, ktoré okrem typických základných genetických anomálií zahŕňajú aj špecifické genetické zmeny [2]. Spomínaná nádorová rôznorodosť pramení z charakterizovaných genetických nestálostí a vo zvýšení rýchlosti vzniku mutácií, ktoré sprevádzajú všetky novovzniknuté neoplázie. Glioblastómy sú letálne, nakoľko sa rozsiahlo rozptyľujú cez mozgový parenchým, čo bráni maximálnej chirurgickej resekcií, a taktiež pre ich charakteristickú vysokú vaskularizáciu. Potreba cielenej liečby na inhibíciu migrácie, angiogenézy a potlačenie transportu buniek je pre daný typ nádoru veľmi žiadaná. Neexistujú dedičné črty, ktoré by predisponovali vzniku glioblastómu, všetky charakterizované genetické zmeny sú somatické a získané. V tejto práci chceme poukázať na najčastejšie ovplyvnené signalizačné dráhy daného malígneho typu a ich možnosti využitia v personalizovanom medicínskom prístupe.

PATOGENÉZA GLIOBLASTÓMOV

Dráhy onkogenézy

Najčastejšiu zmenu podstupuje signálna dráha receptorov tyrozín kináz (RTK) [3]. Dané receptory sú lokalizované na povrchu bunky, kde viažu rastové faktory (RF). Väzba rastových faktorov je vo forme cross-link prepojení, čím indukuje dimerizáciu dvoch priľahlých receptorov s následným konformačným posunom. Tento presun aktivuje kinázovú funkciu RTK, s využitím krížovej fosforylácie tyrozínových zvyškov v príprave na nadväzujúce signalizačné kaskády (obr. 1). Receptory epidermálneho rastového faktora (EGFR) signalizujú funkcie ohľadom proliferácie, migrácie, diferenciácie a prežívania všetkých typov buniek centrálneho nervového systému [4]. V GBM bunkách môže byť signalizácia EGFR aktivovaná na základe zvýšenej expresie receptora alebo jeho ligandu, amplifikácie EGFR lokusu, a/alebo mutácie receptora. Je dôležité poznamenať, že akákoľvek kombinácia týchto zmien môže koexistovať v rámci jedného nádoru. Onkogénne vlastnosti EGFR sú spojené s aktiváciou a nekontrolovateľným rastom fosforylačnej aktivity. Väčšina glioblastómov, ktoré majú zvýšenú aktivitu EGFR majú taktiež aj mutáciu génu *EGFR*. Najčastejšia mutácia je v *EGFRvIII*, ktorá korešponduje so stratou exónov 2-7, čo vedie k vyradeniu 267 aminokyselín v extracelulárnej doméne s následnou tvorbou samostatne a konštitučne aktívneho liganda. Táto mutácia nie je nikdy pozorovaná v zdravých tkanivách, ani v sekundárnych glioblastómoch [5].



Obrázok 1: Genetické zmeny v kľúčových dráhach glioblastómu. Mutácie, delécie a amplifikácie pre jednotlivé dráhy: RTK/RAS/PI3K; RB a p53. Zelené boxy indikujú aktiváciu mutácií a amplifikácií. Červené boxy predstavujú neaktívne alterácie ako sú mutácie a delécie [Upravené podľa zdroja 6].

Ďalšie časté zmeny signálov pri glioblastómových nádoroch patria dráhe Ras (G-proteíny; malé guanozín trifosfátové hydrolázy). Zvýšenie aktivity Ras dráhy je pozorované u takmer všetkých typov gliómových tumorov, i keď mutácie Ras nie sú veľmi bežné [7]. Dané zvýšené hladiny (pri absencii mutácií Ras) môžu byť pripisované nárastu aktivácií regulačných faktorov, akým je aj EGFR (obr. 1). Ras je proteín viažuci guanozín (G proteín), ktorý cyklicky prechádza z neaktívnej formy (viazaný na GDP) na aktívnu (viazaný na GTP). Aktívny Ras (Ras-GTP) podporuje progresiu v rámci bunkového cyklu, prežitia a migrácie cez kaskádu deregulačných efektorov.

Dráha fosfatidylinozitol-4,5-difosfát 3-kináza/fosfatázy a Tenzínového homológa/serín treonínovej kinázy Akt (PI3K/PTEN/Akt) je taktiež spúšťaná interakciami receptora RF (obr. 1). Po aktivácii spomínaného receptora je PI3K vtiahnutá do bunkovej membrány, čo vyúsťuje do generácie sekundárnych poslov fosfatidylinozitol (3,4,5)-trisfosfátu (PIP3). Inhibujúcim efektorom PIP3 je Akt, čoho výsledkom je bunková proliferácia a zábrana apoptózy. PTEN sa bežne prejavuje ako negatívny regulátor PI3K a ukončuje signál PIP3. V GBM, funkcia PTEN ako tumorového supresora je často inaktivovaná stratou heterozygoty, alebo mutáciou-indukovanej konštitutívnej aktivácii PI3K, ktorá vytvára zvýšenú dostupnosť PI3K [8].

Dráha regulujúca génom retinoblastómu (RB) zohráva kľúčovú úlohu pri bunkovom cykle. V bunkách, ktoré sú nečinné alebo neproliferujúce je proteín RB hypo-fosforylovaný a aktívne sa viaže na transkripčný faktor E2F. Väzba RB na E2F zabraňuje transkripcii génov, ktoré sú potrebné pre mitózu a bunkový cyklus je tak zastavený v kontrolnom bode G1/S. V proliferujúcich bunkách, RF indukujú tvorbu cyklín D1 a aktivujú kinázovo-cyklínové komplexy (CDK). Aktívne CDK komplexy fosforylujú RB,

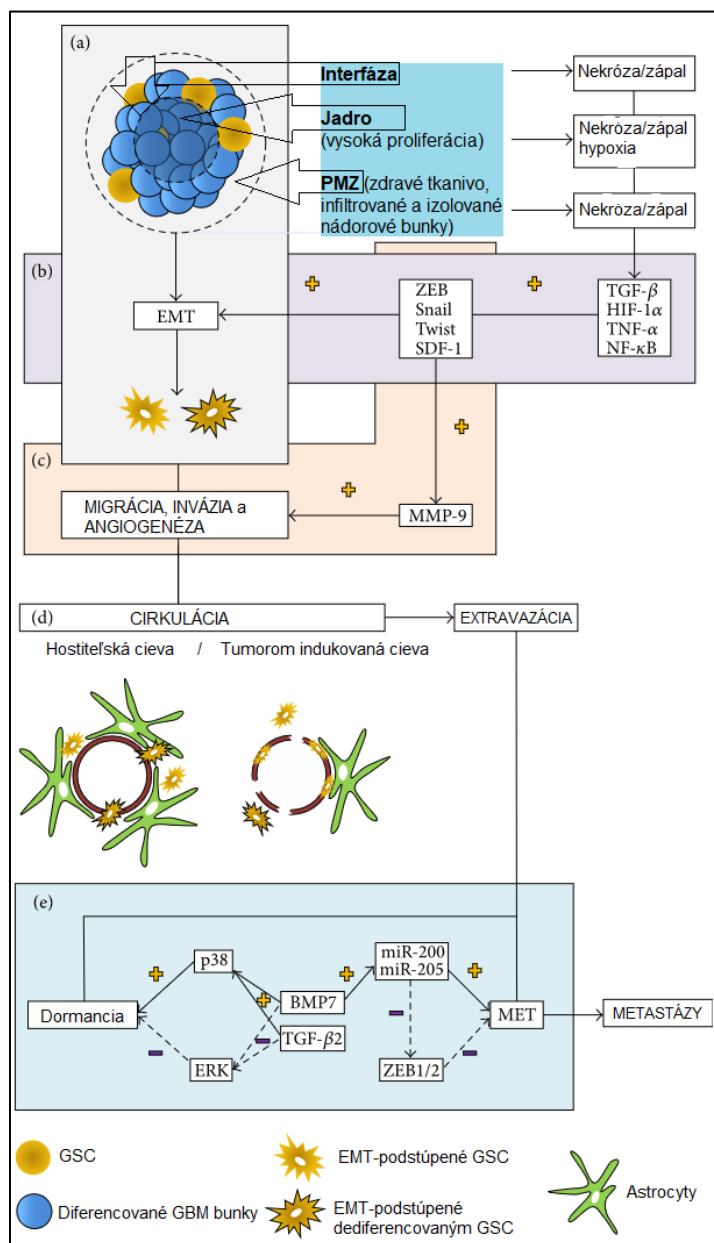
čo má za následok uvoľnenie E2F. Voľný E2F indukuje transkripcie génov, ktoré podporujú DNA syntézu a tým spúšťajú bunkovú proliferáciu. Negatívna regulácia RB dráhy môže byť dosiahnutá cyklín-závislých kinázových inhibítorov (CDKN). Niektoré GBM bunky môžu potláčať túto negatívnu reguláciu vďaka metylácii RB promótora a utlmeniu génu. Zmena RB dráhy vedie k závažným nerovnovážiam v bunkovom cykle (obr. 1) [9].

Dráha tumor supresorového génu *TP53* má výraznú úlohu pri kontrole bunkového cyklu, odpovedi DNA na poruchy, smrti bunky a bunkovej diferenciácii. Pri poškodení DNA je bunka stresovaná a aktivuje sa dráha TP53. Aby časom mohlo dôjsť k oprave DNA, TP53 zvyšuje transkripciu p21, patriaci k CDKN, ktorý viaže cyklín-závislé proteíny a inhibuje ich funkcie aby sa zastavila progresia bunkového cyklu cez G1 fázu. Ak sa vyskytne viac poškodení, ktoré by sa nestíhali napraviť, TP53 vyvolá smrť bunky, čím sa predíde rozdeleniu buniek obsahujúcich mutovanú alebo poškodenú DNA. *TP53* indukuje transkripciu (E3 ubiquitín-protein ligáza) MDM2, čo je proto-onkogén, ktorý vedie k degradácii TP53 a prevencii opravy DNA. Na to, aby sa udržiavala aktivita TP53, CDKN2A-p14ARF deaktivuje MDM2 procesom degradácie. MDM4 (regulátor TP53), môže deaktivovať *TP53* cez viazanie transkripčnej aktivačnej domény [10]. V ľudských gliónoch sú TP53 mutácie často nesprávne zamieňané mutácie, ktoré cieľia na exóny nevyhnutné pre viazanie DNA. Ostatné alternácie prítomné v GBMs sú MDM2 i MDM4 amplifikácia a vyradenie CDKN2A-p14ARF, obr. 1 [11].

V súčasnosti nie je definovaný sled udalostí, ktorý by definitívne viedol k vývoju GBM. Avšak, akákoľvek kombinácia zmien v spomínaných signálnych dráhach môže prispieť k vzniku GBM.

Intratumorová heterogenita

Intratumorová heterogenita (IH) je definovaná ako prítomnosť viacerých odlišných bunkových subpopulácií v rámci jedného nádoru u jedného pacienta [12]. Rôznorodosť tumoru dovoľuje nádorovým bunkám odpovedať na selektívne nátlaky a takto prispievať k ich agresivite, rastu a zlyhaniu terapie [13]. Táto heterogenita predstavuje výzvu pre dizajnovanie nových a efektívnych liekov. V súčasnosti existujú dva navrhované mechanizmy vývoja IH: (i) schopnosť seba obnovy nádorových kmeňových buniek a (ii) samotný klonálny vývoj, ktorý dokáže zvýšiť genetickú rozmanitosť v rámci postihnutých tkanív [14]. Intratumorová heterogenita je priestorovo definovaná od jadra nádoru po jeho okraj. Jadro GBM nádoru je lokalita s vysokou proliferáciou a zápalom, pričom pozostáva zo zóny nekrózy, ktorá je obklopená nádorovou masou (obr. 2). Okraj medzi nádorovým tkanivom a mozgovým parenchýmom sa nazýva rozhranie. Hustota nádorových buniek klesá vzhľadom ku vzdialenosti od jadra, kde je najvyššia [15]. Najvzdialenejšia plocha je periférna mozgová zóna (PMZ), ktorá sa skladá hlavne z mozgového parenchymálneho tkaniva s izolovanými infiltrátmi. Tieto izolované infiltráty rozptýlené medzi normálnymi mozgovými tkanivami v PMZ nám pomáhajú pochopiť, prečo absolútna chirurgická resekcia nie je možná a rekurencia je takmer neodvratná. Viaceré štúdie dokazujú, že biopsie odobrané z jadra a povrchových zón mali oveľa vyššie úrovne genomických zmien v porovnaní s biopsiami tkanív PMZ, čo dokazuje, že zmeny na génovej úrovni sú závislé od lokality nádoru. Tieto výsledky sú jasným ukazovateľom toho, že nádorové fragmenty pochádzajúce od jedného pacienta môžu byť klasifikované do rôznych molekulových podtypov [16]. Recidívy nádoru v primárnom mieste alebo v okolitom mozgovom parenchýme sa vyskytujú často aj napriek novým terapiám a zákrokom. Tieto difúzne a invazívne vlastnosti sú podobné aj pri astrocytómovom type, nakoľko je spojený s migráciou gliómových kmeňových buniek [17].



Obrázok 2: Schéma procesu šírenia glioblastómu

Rovnako ako glioblastómové kmeňové bunky (GSC), aj diferencované bunky GBM môžu podstúpiť epitelálno-mezenchýmálny prechod (EMT) za účelom napadnutia mozgového parenchým. Tento proces je regulovaný rôznymi transkripčnými faktormi, akými sú: faktory zinkového prsta ZEB a SNAIL, Twist proteín, alebo nukleárny faktor κ B (NF- κ B); ktoré sa aktivujú počas zápalových, nekrotických a hypoxických podmienok [a, b]. Výsledkom toho je získanie mezenchýmálnych vlastností buniek a expresia degradačných enzýmov extracelulárneho matrixu (najviac metaloproteinázy-9, MMP-9) s cieľom podpory nádorovej invázie [c]. Nádorové krvné cievy sú zvyčajne neúplné a netesné, preto je podporená intra/extravazácia, čiže prienik nádorových buniek do lúmenu krvných a lymfatických ciev s následným uchytením v mikrovaskulatúre receptívnych orgánov [d]. Za patologických podmienok, je hematoencefalická bariéra často narušená, čo umožňuje GBM bunkám ľahší prechod do krvného riečiska [d]. Keď sú nádorové bunky rozšírené od svojho miesta vzniku, môžu sa stať pokojnými alebo začať proces metastázovania. Táto rovnováha je citlivo regulovaná environmentálnymi podmienkami a ďalšími faktormi (BMP7 alebo TGF β 2), ktoré navodia bunke spánkový režim alebo naštartujú vznik metastáz [e], upravené podľa zdroja [15].

KLASIFIKÁCIA GLIOBLASTÓMU NA ZÁKLADE GENETICKÝCH UKAZOVATEĽOV

Genomické abnormality primárneho a sekundárneho GBM

Väčšinu GBM predstavujú primárne nádory, ktoré vznikli bez predchádzajúceho ochorenia. Primárne GBM sú agresívne, veľmi invazívne nádory, ktoré sa zväčša vyskytujú u starších ľudí. Sekundárne GBM sú oveľa menej bežné a vyskytujú sa hlavne u ľudí mladších ako 45 rokov. Sekundárne GBM vznikajú z low-grade astrocytómov a majú zväčša lepšiu prognózu. Primárne a sekundárne GBM sú histologicky neodlíšiteľné, i keď sa vyvíjajú z odlišných genetických podkladov a vyznačujú sa rozdielnymi genetickými zmenami (tab. 1), ktoré umožňujú ich rozdelenie [18]. Tieto zmeny, nachádzajúce sa najmä v primárnych GBM predstavujú EGFR amplifikácie alebo mutácie, PTEN vyradenie alebo mutácie a CDKN2A-p16INK4a delécie. Amplifikácia alebo mutácia EGFR vyúsťuje do konštitučnej aktivity, zvýšenia proliferácie a prežitia zmutovaných buniek. PTEN delécie alebo mutácie sú takmer jedinečné pri pokročilých fázach ochorenia u primárnych GBM. CDKN2A-p16INK4a delécie sa môžu nachádzať aj pri primárnych, aj pri sekundárnych GBM, i keď sú oveľa častejšie spájané s primárnym GBM. Klinická dôležitosť CDKN2A-p16INK4a delécií nie je zatiaľ stanovená. Genetické zmeny bežne prítomné v

primárných GBM zahŕňajú TP53 mutácie a mutácie izocitrát dehydrogenázy 1/2 (IDH1/2) [19]. TP53 mutácie sú detekovateľné v skorých fázach ochorenia pri sekundárnych GBM. IDH1/2 mutácie sa vyskytujú len zriedka pri primárnych GBM, a nedávno boli označené ako zmeny, ktoré sa často vyskytujú v low-grade gliómoch a v transfere do sekundárnych GBM. IDH1 mutácie sú považované za najdôveryhodnejšie indikátory pri rozlišovaní primárnych a sekundárnych GBM [19]. Zrozumiteľnejší zoznam častejšie sa vyskytujúcich zmien v primárnych verzus sekundárnych GBM sa nachádza v tabuľke 1, i keď tento zoznam nie je ešte stále kompletný.

Tabuľka 1: Najčastejšie sa vyskytujúce mutácie génov pri glioblastómoch [20].

	Primárny GBM	Sekundárny GBM
Genetické alterácie	EGFR amplifikácia CDKN2A-p16 ^{INK4a} delécia LOH ^a chromozómu 10 PTEN mutácia	IDH 1/2 mutácia LOH 22q, 13q, 19q TP53 mutácia
Profil génovo/proteínovej expzie	Centrozómom-asociovaný proteín 350 Enoláza 1 Fas IGFBP2 ^b MMP-9 ^c Survivin Tenaskin-X-prekurzor VEGF VEGF fms-príbuzný TK	ADAMTS-19 ^e ASCL1 ^f S kadhérinom súvisiaci tumor supresor DUOX2 ^g ERCC6 ^h HNRPA3 ⁱ Strata TIMP-3 ^j PDGFR TP53 WNT-11 ^k proteínový prekurzor
Metylácia promótorov	--	CDKN2A-p14 ^{ARF} CDKN2A-p16 ^{INK4a} MGMT ^l RB TIMP-3

Skratky:

^aStrata heterozygocity; ^bInzulín-podobný rastový faktor viažuceho proteínu 2; ^cMatrix metallopeptidáz 9; ^dVaskulárny endoteliálny rastový faktor; ^eDizintegrín a metaloproteináza 19; ^f"Achaete-Scute Family" BHLH transkripčný faktor; ^gDual oxidáza 2; ^hKrížovo-komplementačná skupina excíznej opravy; ⁱJadrový nukleoproteín A3; ^jTkaninový inhibitor metaloproteináz 3; ^kČlen Wnt rodiny 11; ^lO-6-metylguanín-DNA metyltransferáza.

Klasifikácia na báze genómu, epigenómu a transkriptómu

Iniciácia a progres GBM sú viazané na genetické a epigenetické aberácie. Na základe jedinečných genetických profilov môžu byť GBM rozdelené do štyroch skupín: (i) mezenchymálne; (ii) klasické alebo proliferatívne; (iii) pre-neurálne a (iv) neurálne. Tieto molekulárne podtypy sú spojené s odlišnými priestorovými zónami GBM nádoru. Mezenchymálne GBM majú popri delécii neurofibromínu 1 (NF1) aj zvýšenú expresiu mezenchymálnych a astrocytómových markerov. Neurofibromín 1 zvyčajne funguje ako negatívny regulátor dráhy Ras. Klasický podtyp sa vyznačuje vysokou úrovňou proliferácie asociovanou s EGFR amplifikáciou. Proneurálny podtyp GBM je prítomný s alteráciami v TP53, PDGFRA, PIK3C a IDH1. Tieto GBM sa vyskytujú najmä u mladších pacientov a sú asociované s priaznivým výstupom. Neurálne podtypy GBM predstavujú silnú kompozíciu génov, ktoré sa vyskytujú vo vývoji a funkcii nervového systému [21]. Mezenchymálne a klasické podtypy sú zväčša spojené s agresívnejšími gliómami vyššej úrovne, zatiaľ čo proneurálny podtyp reprezentuje menej agresívne gliómy. Aj napriek tomuto faktoru sú však mezenchymálne, klasické aj proneurálne podtypy asociované s nádorovým tkanivom. Ďalší zhľad nádorov bol nedávno identifikovaný na základe CpG metylačných fenotypových ostrovov. Tieto nádory majú viaceré alterácie, DNA metylačné obrazce a transkriptomické

profily v porovnaní s ostatnými štyrmi podtypmi GBM a sú priradované k nádorom s veľmi priaznivým terapeutickým výsledkom.

Proces vzniku glioblastómového postihnutia je charakterizovaný unikátnym setom molekulárnych zmien v bunkách a ich mikroprostredím. Je často evidentné, že tieto procesy sa líšia nielen medzi pacientmi, ale taktiež medzi podtypmi v rámci jedného nádoru. Tieto rozdiely poukazujú na odlišnosti, ktoré sú viditeľné najmä pri vyvíjaní nových cielených liečebných terapií.

GENOMICKÉ POZADIE GLIOBLASTÓMU

Somatické mutácie

Somatické aberácie predstavujú mutácie, ktoré nie sú dedičné, čiže môžu vznikať spontánne v somatických bunkách v dôsledku chýb vyskytujúcich sa pri replikácii DNA alebo pri expozícii na mutagény životného prostredia. Výsledkom týchto mutácií dochádza k bunkovej transformácii a nádorovej progresii. Jedným z prístupov k určeniu, ktoré gény sú za pozitívnu selekciu GBM zodpovedné paralelné mutácií. Paralelné alebo opakujúce sa mutácie sú identické nukleotidové substitúcie, prítomné na rovnakých miestach nádoru u rôznych pacientov. Dané mutácie sú silným predpokladom pre pozitívnu selekciu GBM identifikujúcich génov, nakoľko náhodná fixácia rovnakých mutácií u odlišných pacientov je vysoko nepravdepodobná [22]. V práci od Lombardiho a Assema (2017) je uvedený zoznam signifikantne mutovaných génov, ktoré zohrávajú paralelu pri určovaní GBM, pričom najviac frekventovaný výskyt bol zaznamenaný u týchto génov: *PTEN*, *EGFR*, *TP53*, *PIK3RI*, *RB* a *IDH1*. Výhodou použitia paralelizmu je identifikovanej selekcie glioblastómového postihnutia aj keď celkové počty mutovaných génov nevykazujú štatistickú významnosť [6].

Numerické chromozómové aberácie

Chromozómové aberácie v počte kópií predstavujú somatické zmeny v chromozómovej štruktúre, ktorých výsledkom je strata alebo získanie opakujúcich sa sekvencií v DNA. Práve počty variabilných kópií medzi somatickými, pohlavnými a nádorovými tkanivami sú rozdielne. Pri GBM môžeme pozorovať celkovú alebo čiastkovú stratu chromozómu 9 a 10; polyzómiu na chromozómoch 7, 19 a 20; deléciu *CDKN2A/B* lokusa; a vysokú amplifikáciu *EGFR* lokusa. Najskôr sa vyskytujúce aberácie pri GBM evolúcii sú cielené na chromozómy 7 a 10. Aberácie v iných známych spúšťačoch GBM sa sústreďujú do amplifikácie receptora pre doštičkový rastový faktor (*PDGFRA*), v oblasti Y-box (*SOX2*), ďalej *MDM2* a *MDM4*. Spomenuté aberácie sa môžu vyskytnúť v rôznych nádorových fázach [6,16].

Záver

Personalizovaná terapia založená na OMIC výstupoch predstavuje zhromažďovanie údajov na základe genomiky, transkriptomiky, proteomiky a metabolomiky. Vznikla za účelom vytvorenia špecifických terapeutických prístupov k pacientom pre nastolenie efektívnejšej liečby onkologických chorôb. Avšak intratumorová heterogenita utlmuje súčasné snahy o stabilizovaní molekulárnych biomarkerov. Nakoľko genetické zmeny nie sú spoločné pre všetky časti tkaniva v rámci toho istého pacienta, preto terapia podľa štandardných protokolov nemôže byť účinná, resp. dosahovať podobný efekt u všetkých pacientov. Využívajúc OMIC-technológie, je možné predpokladať, že liečba multimorfného glioblastómu môže mať rovnaký efekt ako sa v súčasnosti používa liečba HIV choroby. Kde sa po diagnostikovaní pacientov vykonáva testovanie rezistencie na špecifický kmeň vírusu. Na základe daných výstupov má lekár možnosť kombinovanej terapie z ktorej si vyberie takú aby bola pre jednotlivého pacienta najvýhodnejšia.

Pre úspech liečby GBM by bolo ideálne odobrať resekciu nádoru pred a po liečbe, aby bola sekvenovaná a analyzovaná niekoľkými OMIC technológiami, tým by sa navrhol režim cielennej terapie a zároveň by sa vyšlo rozvoju rezistencie. Kombinované terapie budú tak predstavovať elimináciu toxicity, zabráňovať liekovým interakciám a monitorovať terapeutickú odpoveď.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA, Ryken TC. Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurg Focus*. 2006;20(4):E1.
- [2] Loeb LA. Human cancers express mutator phenotypes: Origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:450–7.
- [3] Agarwal S, Al-Keilani MS, Alqudah MAY, Sibenaller Z, Ryken TC, Assem M. Tumor derived mutations of protein tyrosine phosphatase receptor type K affect its function and alter sensitivity to chemotherapeutics in glioma. *PLoS One*. 2013;8(5):e62852.
- [4] Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor-mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res*. 2006;12:7261–70.
- [5] Sugawa N, Exstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastoma. *Proc Natl Sci U S A*. 1990; 87:8602–6.
- [6] Lombardi MY, Assem M. Glioblastoma, chapter 1: Glioblastoma Genomics: A Very Complicated Story Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27.
- [7] Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X, Holland EC. Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol Cell*. 2003;12:889–901.
- [8] Oh T, Ivan ME, Sun MZ. PI3K pathway inhibitors: Potential prospects as adjuncts to vaccine immunotherapy for glioblastoma. *Immunotherapy*. 2014;6(6):737–53.
- [9] Knudsen ES, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2010;16:1094–9.
- [10] Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: A novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:223–41.
- [11] Vleeschouwer S De. Glioblastoma. Department of Neurosurgery, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. ISBN-13: 978-0-9944381-2-6.
- [12] Sturm D, Bender S, Jones DT, Lichter P, Grill J, Becher O, et al. Paediatric and adult glioblastoma: Multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:92–107.
- [13] Yap TA, Gerlinger M, Futreal PA, Pusztai L, Swanton C. Intratumor heterogeneity: Seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med*. 2012;4:127.
- [14] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366:883–92.
- [15] Lombard A, Goffart N, Rogister B. Glioblastoma circulating cells: Reality, trap or illusion? *Stem Cell Int*. 2015; 182985.
- [16] Aubry M, de Tayrac M, Etcheverry A. “From the core to beyond the margin”: A genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget*. 2015;6(14):12094–109.
- [17] Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Migrating cancer stem cells—An integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):744–9.
- [18] Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study. *Cancer Res*. 2004;64:6892–9.
- [19] Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*. 2012;3:709–22.
- [20] The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455:1061–8.
- [21] Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):157–173.
- [22] Shpak M, Goldberg MM, Cowperthwaite MC. Rapid and convergent evolution in the Glioblastoma multiforme genome. *Genomics*. 2015;105(3):159–167.

NÁDOROVÁ TERAPIA CIELENÁ NA INHIBÍCIU MITOCHONDRIÁLNYCH FUNKCIÍ

A. Evinová^{1,2} a P. Račay^{1,2}

¹*Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave*

²*Ústav lekárskej biochémie, JLF UK v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave*

Korešpondujúca osoba:

RNDr. Andrea Evinová, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Divízia Neurovedy, BioMED Martin

Malá Hora 4D - 036 01 Martin – SK

E-mail: evinova@jfmmed.uniba.sk

Abstrakt

Rôzne typy nádorových ochorení sa vyvíjajú jedinečnými spôsobmi vzhľadom na charakteristickú senzitivitu voči podávaným protinádorovým liečivám. Okrem toho je známe, že vo vnútri tumoru existuje určitý stupeň bunkovej diverzity, ktorý zahŕňa kmeňové nádorové bunky tzv. *tumor-initiating cells* (TICs) a diferencované bunky - s mierne odlišnými stupňami diferenciácie. Vo svetle nových súvislostí, že mitochondrie zohrávajú dôležitú úlohu pri progresii nádorových ochorení ako aj neuro-muskulárnych ochorení, môžeme hovoriť o „mitochondriálnej medicíne“. Porozumieť cielenej mitochondriálnej terapii a vyvíjať špecifické mitochondriálne liečivá je základom mitochondriálnej medicíny. Mitochondriálna dysfunkcia nádorových buniek môže ponúkať nové možnosti pre ich terapiu. Tieto činidlá môžu ovplyvňovať priamo mitochondriálne genetické zmeny, alebo dráhy ako sú glykolýza, oxidatívna fosforylácia, metabolizmus glutamínu či aktivácia retrográdnej signalizácie. Nádorové bunky sú schopné prispôsobiť svoj bioenergetický profil v závislosti od mikroenvironmentálnych podmienok a dostupnosti živín. Táto metabolická plasticita umožňuje subpopuláciám nádorových buniek prepínať medzi glykolýzou a OXPHOS, aby pokryli svoje bioenergetické a biosyntetické potreby. Kombinované farmakologické stratégie, ktorých terapia je cieleňá na mitochondriálne metabolické dráhy by mala byť vyžadovaná pre efektívne odstánenie nádorovej masy a sprievodné odstránenie malých subpopulácií mitochondriálne – narušených nádorových buniek, ktoré môžu zapríčiniť chemorezistenciu a relaps ochorenia.

Kľúčové slová: glykolýza, mitochondrie, nádor, oxidatívna fosforylácia, terapia

Úvod

Každý typ nádorového ochorenia sa vyvíja jedinečným spôsobom vzhľadom na charakteristickú senzitivitu voči podávaným protinádorovým liečivám. Okrem toho je známe, že vo vnútri tumoru existuje určitý stupeň bunkovej diverzity, ktorý zahŕňa tzv. kmeňové nádorové bunky (TICs – z *ang. tumor-initiating cells* alebo CSCs - *cancer stem cells*) a diferencované bunky - s mierne odlišnými stupňami diferenciácie. Tieto TICs sú v súčasnosti považované za kmeňové nádorové bunky a sú zodpovedné za relapsy po terapii práve kvôli ich schopnosti vyvinúť si rezistenciu na chemoterapiu. Bolo zistené, že TICs vykazujú nízku bunkovú proliferačnú rýchlosť, vysokú rýchlosť seba-obnovy a majú potenciál diferencovať sa na vysoko proliferačné nádorové bunky. Tiež vykazujú aj rezistenciu voči liečivám a/alebo rádioterapii. Heterogenita buniek vnútri tumoru je sprevádzaná aj výraznými zmenami v metabolickom profile v závislosti od typu buniek, ktorá môže uľahčiť nádorovej bunke prežívať aj zmenených mikroenvironmentálnych podmienkach ako aj počas a po chemoterapii [1]. O. Warburg bol prvý, ktorý demonštroval, že nádorové bunky majú pozmenený energetický metabolizmus, t.j. vo vyššej miere využívajú glykolytickú dráhu aj za prítomnosti kyslíka. Tento „Warburgov efekt“ je charakteristickým znakom nádorových ochorení. Dostupnosť glukózy, glutamínu a kyslíka je v nádore priestorovo rôznorodá v porovnaní s podmienkami v dobre perfundovaných orgánoch. Uhlíky odvodené od glukózy sú používané na syntézu aminokyselín, mastných a nukleových kyselín, teda podporujú rozvoj nádorového ochorenia. Nádorové bunky, obsahujúce mutácie v dôsledku ktorých je narušený citrátový cyklus alebo elektrónový transportný systém (ETS), a teda ATP produkcia je závislá na glykolýze, stále potrebujú aktívne mitochondrie na tvorbu metabolitov z glutamínu [2].

Metabolický fenotyp nádorových buniek

Pôvodne sa predpokladalo, že TICs by mali prejavovať metabolický fenotyp pripomínajúci hierarchiu zdravého tkaniva, pričom multipotentné kmeňové bunky sú v podstate glykolytické, zatiaľ čo diferencované somatické bunky využívajú primárne oxidatívnu fosforyláciu (OXPHOS) [3]. Podobné schémy boli popísané u indukovaných pluripotentných kmeňových buniek (iPS), kde je preprogramovanie spojené so zmenou z OXPHOS na glykolytický program tvorby ATP, ktorý je esenciálny pre úspešné nadobudnutie pluripotentného stavu. Tieto zistenia nepredpokladajú iba to, že metabolický fenotyp a vlastnosti kmeňových buniek (*stemness*) sú vnútorne prepojené, ale skôr to, že metabolický fenotyp v skutočnosti kontroluje vlastnosti kmeňových buniek [1]. Bolo zistené, že aeróbna glykolýza je preferovaná u TICs buniek karcinómu prsníka, nasofaryngeálneho a u hepatocelulárneho karcinómu [4,5]. Prekvapujúco, u niektorých typov nádorových buniek bolo demonštrované, že uprednostňujú zisk energie oxidatívnou fosforyláciou. To bolo dokázané u buniek karcinómu pľúc, CD133⁺ buniek glioblastómu, pankreatického ductálneho adenokarcinómu a u leukemických kmeňových buniek v pokojovom štádiu [6,7]. Okrem glukózy, TICs môžu tiež vytvárať ATP a NADPH oxidáciou mastných kyselín (FAO - z *ang. fatty acid oxidation*) v mitochondriách. Seba-obnova u hematopoetických kmeňových buniek ako aj pri leukémii-iniciujúcich buniek sa zdá byť závislá na FAO, na metabolickom procese ktorý udržiava tvorbu ATP a prežívanie epiteliálnych nádorových buniek po strate pripojenia k matrixu. Preto, inhibícia FAO ponúka prídavnú farmakologickú stratégiu na ovplyvnenie mitochondriálneho metabolizmu u TICs [8]. Hoci mechanizmus, ktorý determinuje pozorovaný OXPHOS fenotyp nebol zatiaľ úplne charakterizovaný pre všetky spomínané typy nádorov, regulačné proteíny mitochondriálnej štruktúry a biogenézy by mohli mať zásadnú úlohu pri udržaní vlastností kmeňových buniek [9]. Metabolická premena (prepnutie) na OXPHOS bola preukázaná v TICs u týchto typov nádorov rezistentných na inhibíciu glykolýzy. Táto premena by mohla bunkám poskytovať väčší stupeň nezávislosti z ohľadu mikroenvironmentálneho prísunu živín. Vlastne, OXPHOS dodáva kmeňovým nádorovým bunkám vyššiu odolnosť pri nedostatku živín, a taktiež ich metabolizmus klesá na bazálnu úroveň, čo je charakteristické pre mnoho solídnych nádorov. Hoci v porovnaní s glykolýzou prebieha OXPHOS zreteľne nižšou rýchlosťou, je to oveľa efektívnejší zdroj tvorby energie. Navyše, laktát vylučovaný diferencovanými nádorovými bunkami, ktoré metabolicky preferujú glykolýzu, môže ďalej slúžiť ako prídavný substrát pre oxidatívnu fosforyláciu pri bunkách závislých na mitochondriálnom metabolizme, ako sú kmeňové nádorové bunky, vytvárajúc tak

metabolický symbiotický systém [10]. Mitochondriálna funkcia je rozhodujúca pre fenotypy TICs. Mitochondrie, slúžiace ako zdroj ATP pre nádorové bunky sa tiež zúčastňujú kontroly rôznych signálnych dráh ako sú apoptóza, uvoľňovanie bioaktívnych reaktívnych foriem kyslíka, či produkcia metabolitov ako napr. acetyl-CoA [11]. Zdá sa, že zosilnená mitochondriálna biogenéza je kľúčový faktor pre funkčnosť kmeňových nádorových buniek v oboch metabolických stavoch - glykolytickom aj OXPHOS dependentnom [6,9].

Liečba zameraná na inhibíciu mitochondriálnych funkcií

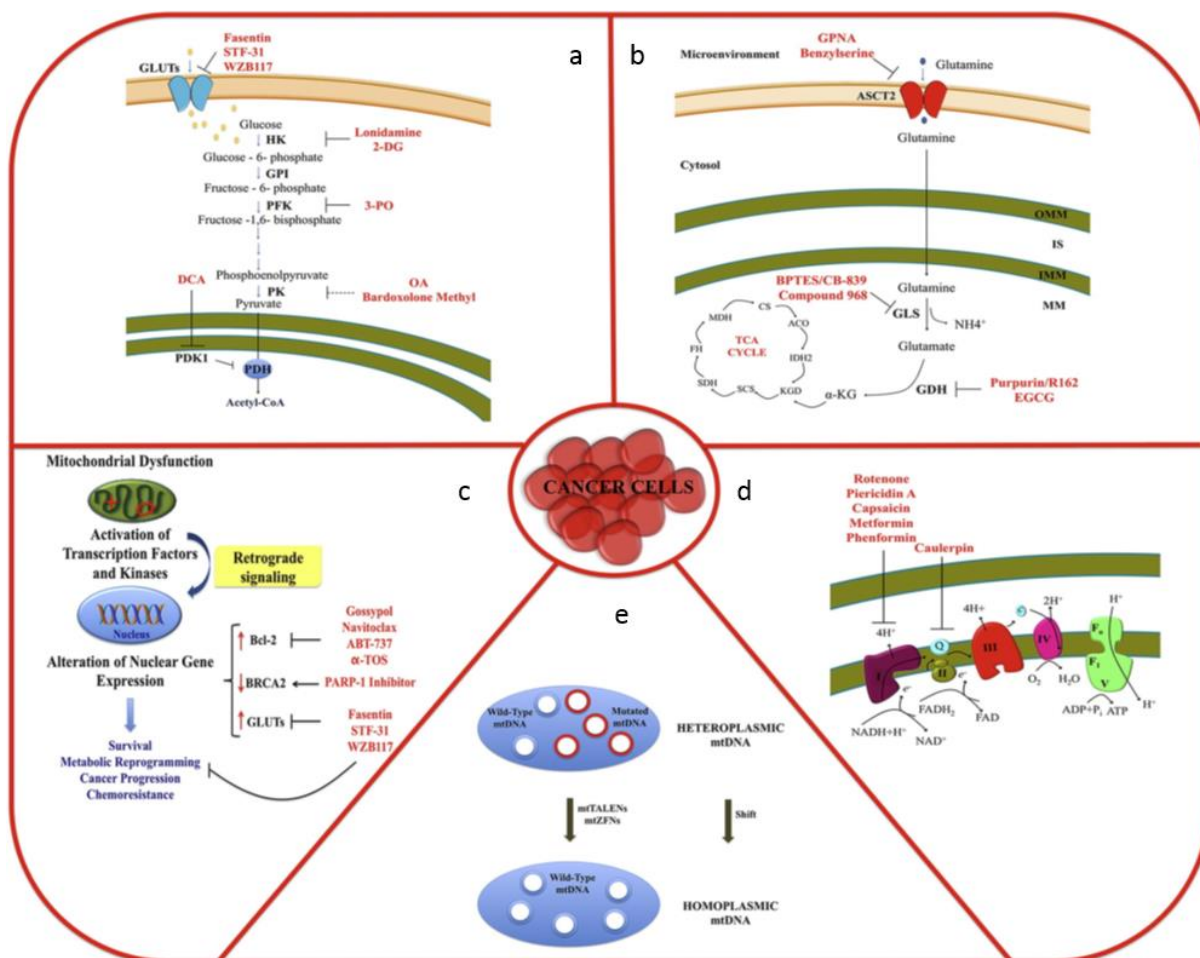
Vo svetle nových súvislostí, že mitochondrie zohrávajú dôležitú úlohu pri progresii nádorových ochorení ako aj neuro-muskulárnych ochorení, môžeme hovoriť o „mitochondriálnej medicíne“. Porozumieť cielej mitochondriálnej terapii a vyvíjať špecifické mitochondriálne agenty (činnidlá, liečivá) je základom mitochondriálnej medicíny. Mitochondriálna dysfunkcia nádorových buniek môže ponúkať nové možnosti pre protinádorovú terapiu. Mitokány (z *ang. mitocans*) mitochondriálne ciele protinádorové liečivá sú klasifikované na základe miesta pôsobenia. Tieto triedy „mitokánov“ sú ciele na: 1. inhibítory hexokinázy; 2. Bcl-2 rodinu bielkovín; 3. tiol-redox inhibítory; 4. VDAC/ANT systém proteínov; 5. elektrónový transportný systém; 6. lipofilné kationy ciele na vnútornú mitochondriálnu membránu; 7. citrátový cyklus; 8. ostatné nezaradené [12]. Tieto činnidlá môžu ovplyvňovať priamo mitochondriálne genetické zmeny, alebo ešte ovplyvňovať dráhy ako sú glykolýza, OXPHOS, metabolizmus glutamínu alebo aktiváciu retrográdnej signalizácie.

Terapia cielej na inhibíciu glykolýzy

Viaceré dôležité enzýmy podieľajúce sa na aeróbnej glykolýze môžu byť využívané pri cielej protinádorovej terapii (Obr. 1a). Fasetín, STF-31 a WZB117 sú ciele na glukózový transportér GLUT1, teda inhibujú absorpciu glukózy. Ďalším cielej enzýmom pri protinádorovej terapii je Hexokináza II, často nadexprimovaným v malígnych tumoroch, môže byť efektívne inhibovaná Lonidaminom a 2-deoxy-D-glukózou. Inhibítory pyruvátdehydrogenázykinázy (PDK), 6-fosfofrukto-1-kinázy a pyruvátkinázy sú ďalšími miestami modulácie zosilnenej glykolýzy nádorových buniek. Inhibícia Warburgovho fenotypu na kritických miestach glykolytickej dráhy by mohla byť účinnou chemoterapeutickou stratégiou. Možno uvažovať o cytostatickom/cytotoxickom účinku v dôsledku zbavenia nádorových buniek zdrojov, ktoré podporujú ich biosyntetické a energetické potreby [13].

Terapia cielej na metabolizmus glutamínu

Nádorové bunky sa často spoliehajú na zvýšenú glutaminolýzu, aby pokryli zvýšené požiadavky na biosyntetické prekursor a NADPH, a udržali funkčný Krebsov cyklus. Glutamín je transportovaný do buniek cez membránové transportéry SLC1A5 a SLC7A2, v mitochondriách je konvertovaný na glutamát glutaminázou (GLS). Potom je konvertovaný na medziprodukt Krebsovho cyklu, α -ketoglutarát buď glutamátdehydrogenázou (GDH) alebo transaminázami (Obr. 1b). Hladina GLS býva zvýšená u rôznych typov nádorov a ukazuje sa, že jej inhibícia znižuje tumorigenézu [14]. Teda inhibícia glutamínového transportu je spôsob, akým možno obmedziť glutamínový metabolizmus pri nádorových ochoreniach. Doposiaľ je GLS najviac študovaný enzým na cielej terapiu, kvôli jeho rozhodujúcej úlohe v metabolizme glutamínu. Analógy glutamínu L-DON, azaserín a aktívne testované v preklinických a klinických štúdiách vykazovali protinádorovú aktivitu, ale neboli vyvíjané ďalej kvôli ich myelosupresívnym, neurotoxickým a gastrotoxickým účinkom [15]. Najlepšie charakterizované inhibítory sú Zlúčenina 938 a BPTES. BPTES alostericky inhibuje GLS stabilizovaním inaktívnej tetramérnej formy enzýmu a Zlúčenina 938 sa prednostne viaže na neaktívnu monomérnu formu enzýmu a inhibuje konformačné zmeny vedúce k aktívnemu enzýmu. CB-839, BPTES derivát je v súčasnosti v 1. fáze klinických štúdií pre solídne a hematologické malignity. Ďalším cielej miestom v terapii je reakcia katalyzovaná GDH. Epigalokatechín, Purpurín a jeho derivát R162 sú nové, viac špecifické GDH inhibítory, ktoré indukujú zvýšenie ROS hladín a inhibujú rast tumoru v nádorových xenoimplantátoch [14]. Použitie inhibítorov glutamínového metabolizmu pri kombinovanej chemoterapii, môže viesť k redukcii chemorezistencie niektorých liečiv [13].



Obr. 1: Potenciálne stratégie na liečbu nádorových buniek s mitochondriálnou dysfunkciou, a. liečba nádorových buniek s defektmi OXPHOS môže byť cieľená inhibítorami glykolytickej dráhy; b. glutamínový metabolizmus môže byť využívaný pri protinádorovej terapii; c. retrográdna signalizácia aktivovaná mitochondriálnou dysfunkciou môže reprezentovať potenciálny terapeutický cieľ; d. Nádorové bunky pri nedostatku glukózy v mikroenvironmente sú senzitívne voči CI a CII inhibítorom dýchacieho reťazca; e. Nádorové bunky s heteroplazmatickou patogénnou mtDNA môžu byť cieľené vysoko špecifickými endonukleázami (prevzatý od [13]).

Terapia cieľená na retrográdnú signalizáciu

Mitochondriálna dysfunkcia spúšťa signálnu dráhu v smere od mitochondrie k jadrú. Vedie k aktivácii transkripčných faktorov, a nakoniec aj k zmenám v expresii bielkovín vedúcich k rezistencii voči apoptotickým podnetom a progresii nádorového ochorenia (Obr. 1c). Rezistencia voči apoptotickým signálom bola asociovaná so zvýšenými hladinami anti-apoptotickej Bcl-2 rodiny bielkovín, tie prenášajú informácie pomocou interakcií ich BH3 domén. BH3 mimetiká ako sú Gossypol, Navitoclax, ABT-737 a α-tokoferyl sukcinát prerušujú tieto interakcie a dovoľujú Bax a Bak vytvoriť membránové kanály iniciujúce apoptózu [12]. Navitoclax je v I/II. fáze klinických štúdií u pacientov s BRAF-mutantným melanómom a u metastatických alebo neoperovateľných solídnych nádorov. Ďalej sa v oblasti cieľenej terapie zameriava na tumor supresorovú bielkovinu BRCA2, ktorá reguluje homológnu rekombináciu v DNA reparačných procesoch. Znížená hladina BRCA2 bola demonštrovaná u prostatických a prsníkových nádorových buniek s poškodenou mtDNA. Nádorové bunky, ktorým chýba funkčná bielkovina sú asi 1000 krát senzitívnejšie voči PARP inhibítorom. V súčasnosti sa skúma v I/II. fáze klinických testov terapeutický potenciál PARP inhibítorov v kombinácii s ďalšími chemoterapeutikami pri liečbe zriedkavých rozvinutých nádorov [16]. Kombinácia PARP inhibítora spolu s inhibítorom Akt je v súčasnosti v I.fáze klinických testov u pacientov s rozvinutými solídnymi nádormi [13].

Terapia cielená na mitochondriálne respiračné komplexy

Nádorové bunky sú schopné prispôsobiť svoj bioenergetický profil v závislosti od mikroenvironmentálnych podmienok a dostupnosti živín. Táto metabolická plasticita umožňuje subpopuláciám nádorových buniek prepínať medzi glykolýzou a OXPHOS, aby pokryli svoje bioenergetické a biosyntetické potreby a prežili aj chemoterapiu [17]. Nedávny experimentálny dôkaz ukázal, že kombinované terapeutické stratégie zacielené na obe - glykolýzu aj mitochondriálnu funkciu - môžu byť pre nádorové bunky letálne. Hladina glukózy v nádore je často 3 - 10 násobne nižšia v porovnaní so zdravým tkanivom [18]. Stimulácia aktivity dýchacieho reťazca za prítomnosti zníženej hladiny glukózy v mikroenvironmente by mohla urobiť glykolytické nádorové bunky senzitívnejšie voči OXPHOS inhibítormi (CI a CII inhibítory) (Obr. 1d). Teda chemo-manipulácia obidvoch glykolitickej a mitochondriálnej dráhy zároveň, by mohla byť užitočná pri eliminácii nádorových buniek. Nádorové bunky liečené inhibítormi mitochondriálnych respiračných komplexov (Rotenón, Piericidin A, Kapsaicín, Caulerpin) indukujú metabolické prepínanie na glykolýzu, a tak sa stávajú hypersenzitívnymi voči inhibítormi glykolýzy. Zatiaľ čo inhibíciou glykolýzy sa nádorové bunky môžu stať viac závislé na OXPHOS, a tým byť senzitívnejšie voči inhibítormi dýchacieho reťazca [19]. Caulerpin, nová trieda inhibítorov CII komplexu potvrdzuje, že dysregulácia OXPHOS môže byť efektívne cielená v protinádorovej terapii [20]. Tieto výsledky zdôrazňujú blízky vzťah medzi hladinou glukózy a funkciou mitochondriálnej OXPHOS, ako aj dôležitosť mikroenvironmentu pri zvažovaní chemoterapeutickej liečby.

Terapia cielená na mutantnú mitochondriálnu DNA(mtDNA)

Stratégie editácie genómu, ako sú nukleázy zinkového prstu (ZFNs z ang. *Zinc Finger Nucleases*) a nukleázy transkripčného aktivátora-ako efektora (TALENs z ang. *transcription activator-like effector*), sa objavujú ako alternatívne možnosti pre nádorové ochorenia pochádzajúce z heteroplazmatických mtDNA mutácií (Obr. 1e). Využitie ZFNs a TALENs sa zameriava na zníženie množstva mutantnej mtDNA preto, aby sa zlepšila OXPHOS dysfunkcia na nepatologickú hladinu. Každá ZFN doména rozpoznáva 3 bp DNA a TALEN doména rozpoznáva 1 bp DNA. Nezávisle od typu endonukleázy, tento prístup vyžaduje vysokú špecifitu endonukleázy, ktorá rozpozná mutovaný ale nie divoký haplotyp. Spojenie ligázou bude následne viesť k poškodeniu mtDNA. Avšak, reziduálna (divoký typ) mtDNA sa bude replikovať aby sa obnovila. Kvôli špecifickému štiepeniu, reziduálna mtDNA nebude citlivá voči endonukleáze [21]. Použitie mtZFNs a mtTALENs je v počiatočnej fáze a sú potrebné ďalšie štúdie a optimalizácia metód (úspešné doručenie ZFNs a TALENs do mitochondrií, zmena pomeru mutantnej mtDNA a *divokej* mtDNA). Otvára však cestu pre potencionálne použitie týchto stratégií pri kombinovaných terapiách u pacientov s rakovinou s mitochondriálnymi dysfunkciami pochádzajúcimi z mtDNA mutácií.

Záver

Väčšina nádorových buniek preukazuje odchýlky od „normálneho“ energetického metabolizmu, ktorý im dovoľuje prežiť, a niekedy aj prosperovať v zhoršených podmienkach ako sú hypoxia a nízka hladina živín, čo je typické pre objemné tumory. Mitochondriálna dysfunkcia, v škále od veľmi nízkej aktivity až po hyperaktiváciu mitochondriálnych funkcií bola popísaná u rôznych typov nádorov. V tomto zmysle sa terapia cielená na zmenený mitochondriálny metabolizmus stala veľmi významnou v oblasti štúdia nádorových ochorení. Výskum na metabolizme založenej terapii sa zaoberá hlavne štúdiom, aké sú nutrienty a enzymatické aktivity, ktoré nádorové bunky potrebujú na prežívanie vo vyššej miere ako normálne bunky. Treba podotknúť, že rôzne typy nádorových buniek podliehajú rôznym metabolickým adaptáciám (viac glykolytické alebo oxidatívne) v závislosti od stupňa malignity. Okrem toho aj heterogenita a metabolická plasticita vnútri tumoru má za následok rozdielne bioenergetické profily v rámci jednej nádorovej masy (v závislosti aj od dostupnosti živín a kyslíka). Kombinované farmakologické stratégie, ktorých terapia je cielená na mitochondriálne metabolické dráhy by mala byť vyžadovaná pre efektívne odstánenie nádorovej masy a sprievodné odstránenie malých subpopulácií mitochondriálne –narušených nádorových buniek, ktoré môžu zapríčiniť chemorezistenciu a relaps ochorenia [12].

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Sancho P, Barneda D, Heeschen C (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism, *Br. J. Cancer* 114, 1305–1312.
- [2] Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, Yang Y, Linehan WM, Chandel NS, DeBerardinis RJ (2012) Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481, 385–388.
- [3] Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A (2012) Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 11, 596–606.
- [4] Shen YA, Wang CY, Hsieh YT, Chen YJ, Wei YH (2015) Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Cycle* 14, 86–98.
- [5] Chen CL, Uthaya Kumar DB, Punj V, Xu J, Sher L, Tahara SM, Hess S, Machida K (2015) NANOG metabolically reprograms tumor-initiating stem-like cells through tumorigenic changes in oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism. *Cell Metab* 23, 206–219.
- [6] Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, Barneda D, Sellers K, Campos-Olivas R, Grana O, Viera CR, Yuneva M, Sainz Jr B, Heeschen C (2015) MYC/PGC-1 α balance determines the metabolic phenotype and plasticity of pancreatic cancer stem cells. *Cell Metab* 22, 590–605.
- [7] Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, Ashton JM, Pei S, Grose V, O'Dwyer KM, Liesveld JL, Brookes PS, Becker MW, Jordan CT (2013) BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 329–341.
- [8] Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP (2013) Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 13, 227–232.
- [9] Janiszewska M, Suva ML, Riggi N, Houtkooper RH, Auwerx J, Clement-Schatlo V, Radovanovic I, Rheinbay E, Provero P, Stamenkovic I (2012) Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells. *Genes Dev* 26, 1926–1944.
- [10] Nakajima EC, Van Houten B (2013) Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Mol Carcinog* 52, 329–337.
- [11] Chandel NS (2014) Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol* 12: 34.
- [12] Neuzil J, Dong LF, Rohlena J, Truksa J, Ralph SJ (2013) Classification of mitocans, anticancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion* 13, 199–208.
- [13] Guerra F, Arbini AA, Moro L (2017) Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1858, 686–699.
- [14] Jin L, Alesi GN, Kang S (2016) Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene* 35, 3619–3625.
- [15] Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ (2013) Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J. Clin. Invest.* 123, 3678–3684.
- [16] Arbini AA, Guerra F, Greco M, Marra E, Gandee L, Xiao G, Lotan Y, Gasparre G, Hsieh JT, Moro L (2013) Mitochondrial DNA depletion sensitizes cancer cells to PARP inhibitors by translational and post-translational repression of BRCA2. *Oncogenesis* 2, e82.
- [17] Obre E, Rossignol R, (2015) Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 59 167–181.
- [18] Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T (2009) Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry, *Cancer Res.* 69 4918–4925.
- [19] Liu H, Hu YP, Savaraj N, Priebe W, Lampidis TJ, (2001) Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors, *Biochemistry* 40, 5542–5547.
- [20] Ferramosca A, Conte A, Guerra F, Felling S, Rimoli MG, Mollo E, Zara V, Terlizzi A (2016) Metabolites from invasive pests inhibit mitochondrial complex II: a potential strategy for the treatment of human ovarian carcinoma? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 1133–1138.
- [21] Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Moraes CT (2014) The use of mitochondria-targeted endonucleases to manipulate mtDNA, *Methods Enzymol.* 547, 373–397.

PROTEOMICKÉ PROFILOVANIE A JEHO VYUŽITIE V DIAGNOSTIKE ENDOMETRIÁLNEHO KARCINÓMU

V. Fialková^{1,2}, Z. Tatarková¹, P. Kaplán¹, T. Balhárek³, J. Marcinek³, E. Kúdela⁴, J. Višňovský⁴, P. Žúbor⁴ a J. Hatok¹

¹*Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)*

²*Výskumné centrum AgroBioTech, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Nitra*

³*Ústav patologickej anatómie, JLF UK v Martine a Univerzitná nemocnica Martin (UNM)*

⁴*Gynekologicko-pôrodná klinika, JLF UK v Martine a UNM*

Korešpondujúca osoba:

RNDr. Veronika Fialková, PhD.
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Výskumné centrum AgroBioTech
Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra
veronikacaplakova@gmail.com

Abstrakt

Endometriálny karcinóm patrí medzi časté malígne ochorenie ženských pohlavných orgánov, ktoré značne prispieva k mortalite gynekologických malígnych ochorení. Súčasná klasifikácia endometriálnych karcinómov má svoje limitácie a vyžaduje si preto hľadanie nových strategických postupov a multidisciplinárny prístup v manažovaní liečby pacienta. Súčasné klinické štúdie charakterizujú malígne tkanivo globálne, pričom sa ignorujú individuálne molekulárne znaky tumorov. Proteomické profilovanie endometriálneho malígneho tkaniva je sľubným nástrojom, ktorý môže zlepšiť skorú diagnostiku a personalizovaný prístup v liečbe endometriálneho karcinómu. V našej štúdii sme využili integrovaný prístup citlivých a špecifických proteomických metód 2-DE a MALDI-TOF s cieľom analyzovať proteomický profil endometriálneho karcinómu. Mnohé z identifikovaných proteínov sú zahrnuté v rôznych biologických dráhach a procesoch a ich nesprávna regulácia môže negatívne ovplyvniť progresiu nádorového ochorenia a odpoveď pacienta na liečbu. Navyše, značná heterogenita bola prítomná v proteomickom profile vyšetřovaného súboru. Naše výsledky poukazujú na nevyhnutnú potrebu individualizovaného profilovania pacientok s endometriálnymi karcinómami a hľadania nových stratégií, ktoré si vyžadujú prístup tzv. multidisciplinárnych omics techník v zefektívnení manažmentu liečby tohto nádorového ochorenia.

Kľúčové slová: proteomické profilovanie, endometriálny karcinóm, 2-DE, MALDI-TOF metóda

Úvod

Endometriálny karcinóm (EC) je najčastejším malígnym tumorom ženských pohlavných orgánov a predstavuje 6 % všetkých nádorových ochorení u žien vo vyspelých krajinách [1]. Podľa EUCAN bolo v EÚ zachytených 64 331 nových prípadov, pričom jeho incidencia v Slovenskej republike patrí medzi najvyššie (26,8 / 100 000) [2]. Tradičná klasifikácia endometriálnych karcinómov vychádza z dualistického rozdelenia na typ I (endometroidný endometriálny adenokarcinóm) a typ II (neendometroidný endometriálny karcinóm) na základe klinického priebehu, metabolickej a endokrinnnej charakteristiky tkaniva [3]. V súčasnosti sa však uprednostňuje molekulárna klasifikácia EC podľa projektu Cancer Genome Atlas, ktorá nenašla svoje uplatnenie v klinickej praxi a je len ťažko aplikovateľná pri samotnej liečbe pacienta [4]. I napriek snahe detailnejšieho stratifikovania pacientok podľa molekulárnej charakteristiky, značná časť genomicky zdanlivo identických vzoriek EC môže vykazovať heterogenitu alebo nespadá do žiadnej z charakterizovaných skupín [5]. Dôvodom môže byť špeciálny molekulárny profil odlišných fenotypových foriem EC. Hľadanie molekulárnych markerov, ktoré by stratifikovali pacientky s vysokým malígnym potenciálom a prekancerózne typy EC umožňujú dnes moderné proteomické techniky [6]. Význam proteomického profilovania v tomto nádorovom ochorení popisujú viaceré vedecké štúdie [7,8,9,10]. Hoci, doteraz mnohé identifikované biomarkery s využitím proteomických metód sú asociované s klinickou charakteristikou alebo prognózou endometriálneho karcinómu, žiaden z nich nie je využívaný v klinickej praxi [10]. Proteomické profilovanie s využitím 2-dimenzionálnej polyakrylamidovej gélovej elektroforézy (2-DE PAGE) a hmotnostnej spektrometrie (MALDI-TOF, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*) je dnes rýchlym, citlivým a silným nástrojom, ktorý umožňuje včasnú diagnostiku a personalizovaný prístup v liečbe endometriálneho karcinómu [11]. V našej štúdii sme sa zamerali na stanovenie proteomického profilu agresívnych podtypov endometriálneho karcinómu a identifikovanie proteínov, ktorých nesprávna regulácia môže súvisieť s progresiou nádorového ochorenia. Naše výsledky poukazujú na nevyhnutnú potrebu individualizovaného prístupu štúdia molekulárneho profilu pacientok s EC, a tiež hľadanie nových stratégií, ktoré si vyžadujú prístup tzv. multidisciplinárnych omics techník v zefektívnení manažmentu liečby pacienta.

Súbor pacientov a metódy

Pacienti a klinické vzorky

Vyšetrovaný súbor tvorilo desať pacientok, ktoré boli vyšetrené a selektované na pozitívny nález agresívneho endometriálneho karcinómu a kontrolná skupina (nenádorové tkanivo endometria) z Gynekologicko-pôrodníckej kliniky Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine (JLF) a Univerzitnej nemocnice Martin (UNM) v spolupráci s Ústavom lekárskej biochémie JLF Univerzity Komenského (UK) v Bratislave (Tabuľka 1).

Získané bioptické vzorky tkaniva (25 – 75 mg) boli histologicky vyšetrené na Ústave patologickej anatómie JLF UK a UNM a uchované v sterilných 1,5 ml skúmavkách so stabilizačným roztokom pri teplote - 80 °C pre následnú proteomickú analýzu. Súbor bol rozdelený na kontrolnú skupinu (n = 5) s negatívnou histológiou EC a skupinu agresívnych endometroidných endometriálnych karcinómov (n = 5). Pacientky patrili do Kaukazoidnej rasy geografického územia Slovenska. Pacientky pred samotným chirurgickým odberom tkaniva boli poučené o vedeckej štúdii v súlade s Helsinskou deklaráciou o ľudských štúdiách a podpísali informovaný súhlas. Štúdia bola schválená Etickou Komisiou JLF UK na americkom Úrade pre ochranu zdravia a humánneho výskumu (*Office for Human Research Protection, U.S. Department of Health and Human Services*) s certifikačným kódom IRB00005636, s číslom protokolu IRB 1255/2013.

Tabuľka 1. Charakterizácia vyšetrovaných skupín pacientov.

Vyšetrovaná skupina	Histologická charakteristika	n	Vek (Roky \pm SEM)
Kontrolná skupina	Normálne alebo atrofické endometrium	5	57.32* \pm 2.45
Endometriálny karcinóm	Endometroidný endometriálny karcinóm (grade G3)	5	59.20* \pm 5.73

Príprava tkanivových homogenátov a stanovenie obsahu proteínov

Vzorky endometriálneho tkaniva (cca 20 mg) boli rozpustené a homogenizované v 10-násobnom objeme homogenizačného roztoku (30 mM KH₂PO₄, 5 mM EDTA, 0,3 M sacharóza, pH = 7,0) s 0,3 M fenylmetylsulfonylfuoridom. Pred homogenizáciou boli vzorky premyté vo fosfátovom tlmivom roztoku a homogenizované 30 s pomocou ultrasonikačného homogenizátora. Supernatanty boli následne použité na 1-DE a 2-DE gélovú separačnú elektroforézu. Koncentrácia proteínov bola stanovená pomocou kitu (*DC Protein Assay*, Bio-Rad) pri 750 nm.

Separácia proteínov pomocou 1-DE elektroforézy

1-dimenziálna gélová elektroforéza bola použitá na detekciu celkového proteínového profilu a stanovenie homogenity vyšetrovaných skupín. Tkanivé homogenáty (40 μ g proteínov) boli denaturované pri teplote 95 °C 3 min a následne separované na 12 % SDS-PAGE géli pri konštantnom prúde 45 mA na géľ. Kvantitu proteínov na fixovaných a zafarbených triplikátoch gélov sme analyzovali pomocou denzitometra v programe Quantity One (Bio-Rad).

Separácia proteínov pomocou 2-DE elektroforézy

2-dimenziálna gélová elektroforéza bola použitá na stanovenie presnejšej separácie proteínov na úrovni dvoch dimenzií podľa protokolu z kitu *Ready Prep 2-D Starter Kit* (Bio-Rad). Duplikáty tkanivových homogenátov (250 μ g proteínov) boli precipitované 2-krát v 4-násobnom objeme acetónu, inkubované 2 hodiny pri teplote - 20 °C a scentrifugované pri 11500 g 10 min pri laboratórnej teplote. Supernatanty boli zozbierané a separované na 12 % SDS-PAGE géli pri konštantnom prúde 15 mA / géľ a 25 mA / géľ až po ukončenie separácie. Gély boli zafarbené farbičkou Bio-Safe Coomassie G-250 Stain (Bio-Rad) a kvantita proteínov bola vyhodnotená pomocou denzitometra a softvéru PDQuest (Bio-Rad).

Identifikácia proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie

Vyrezané proteínové spoty alebo proteínové prúžky boli odfarbené 50 % acetonitrilom (ACN) cez noc pri 300 g a teplote 25 °C. Tekutinu sme odsali a následne premyli s 100 % ACN. Po odsatí tekutiny sme proteínové spoty a prúžky redukovali s 10 mM ditiotreitolom 45 min pri teplote 56 °C a alkylovali s 55 mM jodoacetamidom 30 minút v tme. Vzorky sme 2-krát premyli s 25 mM dihydrogenuhličitanom amónnym a 100 % ACN. Po odstránení tekutiny sme vzorky nechali vysušiť a následne inkubovali s 2 % trypsínom 30 min na ľade a štiepli cez noc pri 37 °C. Vzorky sme na druhý deň rozpustili v 10 % kyseline trifluóroctovej a dehydratovali s 100 % ACN a koncentrovali vo vákuovej centrifúge. Potom sme poštičené vzorky (0,75 μ l) naniesli na MALDI platňu (*MTP Anchor Chip Standard*, Bruker) spolu s rovnakým množstvom roztoku matrice (kyselina škoricová, 1mg/ml) a nechali vysušiť. Samotná analýza bola uskutočnená s využitím hmotnostného spektrometra Ultraflexextreme MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight*, Bruker). Získané MS a MS/MS spektrá boli porovnané s databázami SwissProt and NCBI nr pomocou databázového vyhľadávača MASCOT (Matrix Science) s nasledovnými parametrami vyhľadávania: enzým – trypsín; taxonómia – Homo sapiens; globálna modifikácia – karbamidometyl; variabilná modifikácia – oxidácia a tolerancia MS – 50 ppm. Prezentované skóre sú kombináciou MS a MS/MS spektier.

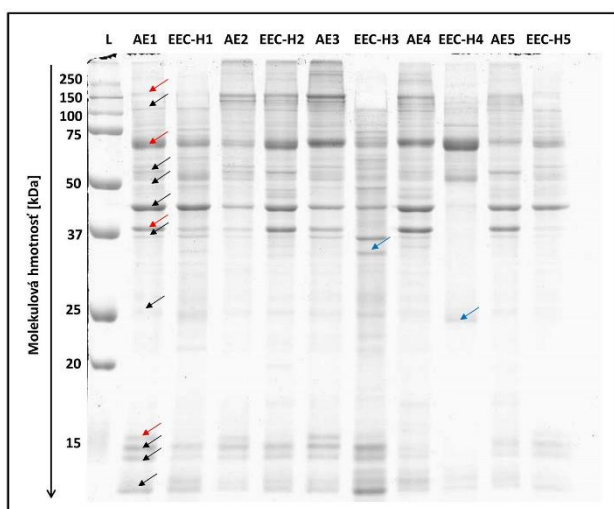
Štatistická analýza

Výsledky sú prezentované ako priemerná hodnota \pm štandardná chyba priemeru (SEM). Štatistická významnosť medzi skupinami bola porovnaná pomocou Student-Neuman-Keult testu, pričom hladina významnosti bola $p < 0,05$.

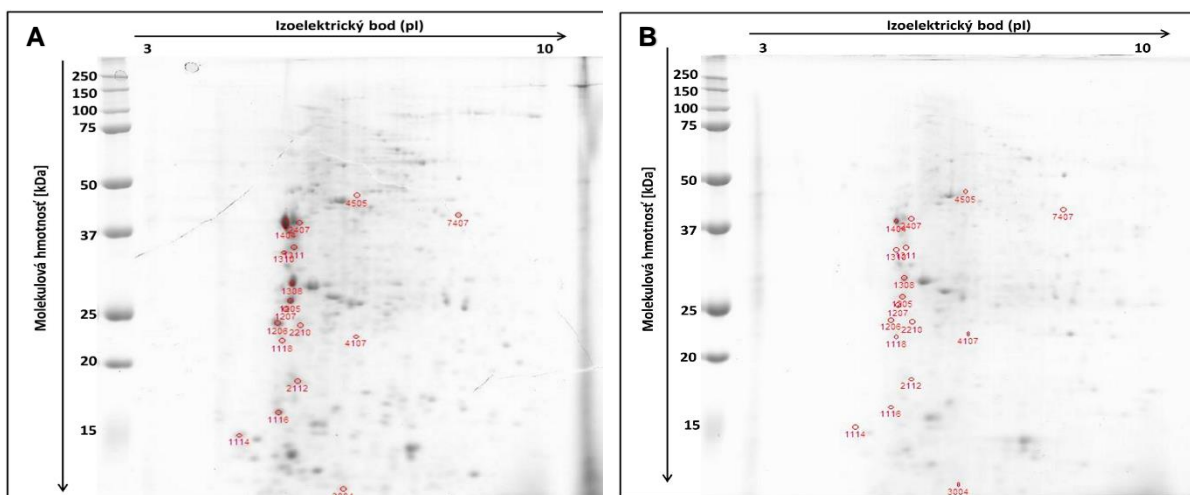
Výsledky

Separácia proteínov 1-DE a 2-DE gélovou elektroforézou

1-DE gélovú elektroforézu sme uskutočnili s cieľom získať hrubý náhľad komplexného proteomického profilu vzoriek (vysoko abundatné proteíny) a selektovať pacientov podľa špecifického profilu. Pozorovali sme, že niektoré vzorky EC i napriek identickej histologicko-patologickej charakteristike sú heterogénne v proteomickom profile. Na základe kvantitatívnych zmien separovaných proteínov sme identifikovali 15 proteínov, z ktorých 4 boli štatisticky pozmenené v proteínovej expresii medzi skupinou EC a kontrolnou skupinou (označené červenými šípkami) (Obrázok 1) a dva proteíny z nich (označené modrými šípkami) boli špecifické (vysoko regulované) pre vzorky s označením EEC-H3 a EEC-H4. Tieto proteíny boli identifikované ako anexín A2 a apolipoproteín A-I.



Obrázok 1. Reprezentatívny 1-DE proteomický profil karcinómov endometria (EEC-H) a kontrolných vzoriek (AE). Čierne šípky reprezentujú nesignifikantné zmeny v proteínovej expresii. Červené šípky reprezentujú proteíny so štatisticky signifikantnou zmenou expresie ($p < 0,05$). Proteínové prúžky znázornené modrými šípkami boli vysoko špecifické pre vzorky EEC-H3 a EEC-H4.



Obrázok 2. Reprezentatívny 2-DE proteomický profil kontrolnej vzorky (A) a nádorového tkaniva (B) s vyznačenými proteínovými spotmi ($n = 17$) so štatisticky signifikantnou zmenou expresie ($p < 0,05$).

S cieľom presnejšieho profilovania proteínov vo vyšetrovaných vzorkách sme použili špecifickejšie 2-DE proteomické profilovanie, pričom heterogénne vzorky neboli zaradené do tejto analýzy. Štatistická analýza odhalila signifikantný rozdiel v expresii v 15 proteínov medzi skupinou EC a kontrolnou skupinou s viac ako 1,5-násobkom zmeny hladiny exprese ($p < 0,05$).

Identifikácia proteínov pomocou MALDI-TOF

V súbore úspešne identifikovaných proteínov so signifikantnou zmenou v hladine exprese sa nachádzali izoformy alebo reťazce tropomyozínov, formy intermediárnych cytoskeletových filamentov, vimentínu a dezminu. Identifikovali sme tiež i niektoré špecifické proteíny zahrnuté v imunitnej odpovedi, bunkovej translácii, proteíny oxidačného stresu, ako aj proteíny, ktoré sú asociované s apoptotickými signálnymi dráhami. Expresia 14 proteínov bola nižšia v EC oproti kontrolnej skupine (Tabuľka 2).

Tabuľka 2. Zoznam odlišne exprimovaných proteínov v endometriálnom karcinóme. Rozdiel v kvantite identifikovaných proteínov bol vyjadrený ako pomer z priemernej hodnoty denzity proteínu v EC ku kontrolnej skupine a štatisticky vyhodnotený.

Názov proteínu	Gén (ID)	Mw [kDa]	pI	Násobok zmeny	Hladina p	Pokrytie sekvencie	MS skóre
Vizinín 1	<i>VSNL1</i>	22,29	5,01	(-5,0)	< 0,01	23 %	58
TPR opakujúci sa proteín 36	<i>TTC36</i>	20,99	5,02	(-2,3)	< 0,01	28 %	50
Prekurzor 2 strômy kostnej drene	<i>BST2</i>	20,04	5,42	(-2,2)	< 0,001	27 %	52
60S ribozomálny proteín PO	<i>RPLP0P6</i>	24,51	5,14	-4,5	< 0,01	27 %	71
Peroxiredoxín 2	<i>PDRX2</i>	22,05	5,66	-4,3	< 0,01	44 %	161
Aktín-väzobný proteín 280, podobný filamínu C	<i>FLNC</i>	19,16	9,13	-1,7	< 0,01	61 %	261
Beta reťazec tropomyozínu	<i>TPM2</i>	32,95	4,66	-4,0	< 0,01	26 %	150
Tropomyozín 2 (beta), izoforma CRA_b	<i>TPM2</i>	26,29	4,57	-3,1	< 0,001	34 %	74
Izoforma alfa-1 reťazca tropomyozínu	<i>TPM1</i>	28,43	4,74	-2,7	< 0,01	23 %	50
Alfa-4 reťazec tropomyozínu	<i>TPM4</i>	28,62	4,67	-2,7	< 0,01	26 %	129
Vimentín, čiastkový	<i>VIM</i>	35,29	4,7	-2,0	< 0,001	22 %	93
Vimentínový variant 3	<i>VIM</i>	49,68	5,19	-9,9	< 0,01	33 %	75
Izoforma X1 beta reťazca tropomyozínu	<i>TPM1</i>	34,50	5,06	-2,1	< 0,001	28 %	186
Dezmín	<i>DES</i>	53,56	5,21	-3,2	< 0,01	51 %	338
Albumín, izoforma CRA-k	<i>ALB</i>	48,57	5,39	4,49	< 0,001	26 %	250

Diskusia

Molekulárne profilovanie nádorových ochorení nachádza čoraz väčšie uplatnenie v skorej diagnostike, ako aj v presnejšej stratifikácii pacientov za účelom efektívnejšieho manažovania liečby. Hoci, mnohé nádorové ochorenia vrátane endometriálnych karcinómov môžu byť geneticky predisponované, nádorová progresia, invázia a metastázovanie sú závislé od funkčnej aktivity proteínov [12]. Proteínové izoformy alebo varianty sú kľúčovými hráčmi, ktoré formujú fenotyp individuálneho ochorenia, a preto sú cieľom preventívnej a personalizovanej medicíny [13,14]. Za účelom lepšieho manažovania liečby

EC a identifikovania potenciálne nových markerov, ktoré by odlišovali vysokorizikové endometroidné endometriálne karcinómy, sme analyzovali proteomický profil karcinómu endometria. Hoci, doteraz mnohé identifikované biomarkery s využitím proteomických metód sú asociované s charakteristikou alebo prognózou EC, žiaden z nich nemá svoje uplatnenie v klinickej praxi [10]. V našej práci sme pomocou MALDI-TOF metódy identifikovali odlišne exprimované proteíny vo vysokorizikových typoch EC, ktoré by mohli poukazovať na agresívny fenotyp tohto ochorenia. Proteíny sme klasifikovali podľa svojej funkcie na niekoľko skupín: proteíny so signalizačnou funkciou (vizinín 1); proteíny bunkovej regulácie (60S ribozomálny proteín PO, TPR opakujúci sa proteín 36); štrukturálne proteíny (aktín-väzobný proteín 280, izoformy tropomyozínov, vimentínu, dezmin); proteíny oxidačného stresu (peroxiredoxín 2); proteíny imunitnej odpovede (prekurzor 2 strómy kostnej drene); proteíny s transportnou funkciou (izoforma CRA-k albumínu). Zmeny expzie týchto proteínov potvrdili už mnohé štúdie [7,8,9,10]. Dnes je známe, že onkogénna transformácia je sprevádzaná stratou aktínových vlákien a zmenou expzie regulačných proteínov dynamiky aktínových vlákien (tropomyozínov), ktoré hrajú významnú úlohu v invázii nádorových a metastatických buniek. Ukázalo sa, že znížená expzia tropomyozínov suprimuje infiltráciu a invazívnosť nádorových buniek endometria [7]. Okrem toho, karcinogénny proces je do značnej miery sprevádzaný mitochondriálnou dysfunkciou ako i zápalovým procesom, ktorý zvyšuje malígny potenciál buniek. V súčasnosti je známy i zoznam biomarkerov, ktoré sú funkčne asociované s týmito procesmi a ich narušená regulácia podporuje malígny proces [15]. Naše výsledky potvrdzujú tento špecifický molekulárny profil vysoko malígnych EC. Väčšina nami identifikovaných proteínov patria do skupiny vysoko abundančných proteínov, ktoré sú zvyčajne funkčne asociované s progresiou a invazívnymi vlastnosťami EC a teda sú súčasťou všeobecného molekulárneho profilu EC. Navyše, v našej práci sme zaznamenali značnú heterogenitu v proteomickom profile vyšetovaných patientskych vzoriek, čo môže odrážať i rôznorodú odpoveď pacienta na terapiu. Identifikácia zvýšenej expzie anexínu A2, či apolipoproteínu A-I u EC predstavuje nezávislý rizikový faktor progresie EC, ktorý zvyšuje jeho metastatický potenciál [16]. Žiaľ, v súčasnosti je málo štúdií, ktoré sa zameriavajú na analýzu individuálnych tumorových markerov a detekciu tzv. atypických alebo špecifických proteínov, ktoré by mohli byť využité v personalizovanej medicíne EC [5].

Záver

Vysoko malígne endometriálne karcinómy značne prispievajú k mortalite gynekologických malígnych ochorení. Proteomické profilovanie s využitím 2-DE PAGE elektroforézy a hmotnostnej spektrometrie (MALDI-TOF) predstavuje významný nástroj pre presnejšiu molekulárnu charakterizáciu ako i včasnú diagnostiku EC. Proteomické profilovanie hrá významnú úlohu v stratifikácii vysokorizikových foriem EC s ohľadom na personalizovaný prístup v liečbe endometriálneho karcinómu. Výsledky našej práce vyzdvihujú potrebu individualizovaného profilovania pacientok s EC a hľadania nových stratégií, ktoré si vyžadujú prístup tzv. multidisciplinárnych omics techník pri zefektívnení manažmentu liečby tohto nádorového ochorenia.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359-386.
- [2] Steliarova-Foucher E, O'Callaghan M, Ferlay J, Masuyer E, Forman D, Comber H, Bray F. European Cancer Observatory: Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in Europe. Version 1.0. European Network of Cancer Registries, International Agency for Research on Cancer. (September 2012).
- [3] Murali R, Soslow RA, Weigelt B (2014) Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol* 15:e266-278.
- [4] Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA (2013) Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497:67-73.
- [5] Mittal P, Klingler-hoffmann M, Arentz G, Zhang C, Kaur G, Oheler MK, Hoffmann P (2016) Proteomics of endometrial cancer diagnosis, treatment and prognosis. *Proteomics Clin Appl* 10:217-229.
- [6] Salvesen HP, Carter SL, Mannelqvist M, Dutt A, Getz G, Stefansson IM, Raedre MB, Sos ML, Engelsen IB, Trovik J, Wik E, Greulich H, Bo TH, Jonassen I, Thomas RK, Zander T, Garraway LA, Oyan AM, Sellers WR, Kalland KH, Meyersson M, Asklen LA, Beroukhir R (2009) Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:4834-4839.
- [7] Yi Z, Jijting C, Yu Z (2009) Proteomics reveals protein profile changes in cyclooxygenase-2 inhibitor-treated endometrial cancer cells. *Int J Gynecol Cancer*. 19:326-333.
- [8] Lambropoulou M, Papadopoulos N, Tripsianis G, Alexiadis G, Pagonopoulou O, Kiziridou A, Liberis V, Kakolyris S, Chatzaki E (2010) Co-expression of survivin, c-erbB2, and cyclooxygenase-2 (COX-2): prognostic value and survival of endometrial cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 136:427-435.
- [9] Maxwell GL, Hood BL, Day R, Chandran U, Kirchner D, Kolli VS, Bateman NW, Allard J, Miller C, Sun M, Flint MS, Zahn C, Oliver J, Banerjee S, Litzim T, Parwani A, Sandburg G, Rose S, Becich MJ, Berchuck A, Kohk E, Risinger JI, Conrads TP (2011) Proteomic analysis of stage I endometrial cancer tissue: identification of proteins associated with oxidative processes and inflammation. *Gynecol Oncol* 121:589-594.
- [10] Attarha S, Andersson S, Mints M, Souchelnytski S (2013) Individualised proteome profiling of human endometrial tumours improves detection of new prognostic markers. *Br J Cancer* 109: 704-713.
- [11] Qui F, Gao YH, Jiang CG, Tian YP, Zhang XJ (2010) Serum proteomic profile analysis for endometrial carcinoma detection with MLADI-TOF MS. *Arch Med Sci* 6:245-52.
- [12] Rocken C, Ebert MP, Roessner A (2004) Proteomics in pathology, research and practice. *Pathol Res Pract* 200: 69-82.
- [13] Golubnitschaja O, Baban B, Boniolo G, Wang W, Bubnov R, Kapalla M, Krapfenbauer K, Mozaffari M, Costigliola V (2016) Medicine in the early twenty-first century: paradigm and anticipation – EPMA position paper 2016. *EPMA J* 7:13167-016-0072-4.
- [14] Zhan X, Long Y, Lu M (2017) Exploration of variations in proteome and metabolome for predictive diagnostics and personalized treatment algorithms: Innovative approach and examples for potential clinical application. *J Proteomics* S1874-3919(17)30307-X.
- [15] Casado-Vela J, Rodriguez-Suarez E, Iloro I, Ametzazurra A, Alkorta N, Garcia-Velasco JA, Matorras R, Prieto B, Gonzalez S, Nagore D, Simón L, Elortza F (2009) Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate. *J Proteome Res* 8:4622-32.
- [16] Bisoendial R, Tabet F, Tak PP, Petrides F, Cuesta Torres LF, Hou L, Cook A, Barter PJ, Weninger W, Rye KA (2015) Apolipoprotein A-I Limits the Negative Effect of Tumor Necrosis Factor on Lymphangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:2443-50.

ÚLOHA TET ENZÝMOV PRI NÁDOROVÝCH OCHORENIACH

E. Gondáš, D. Dobrota a R. Murín

Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)

Korešpondujúca osoba:

Mgr. Radovan Murín, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Ústav lekárskej biochémie

Malá Hora 4D

036 01 Martin

E-mail: radovan.murin@jfmed.uniba.sk

Abstrakt

Aberácie v metylácii DNA ovplyvňujú expresiu génov a bunkový fenotyp, a sú pozorované už v skorých štádiách karcinogenézy. Molekulárne mechanizmy, ktoré sa spolupodieľajú na týchto zmenách, sú predmetom súčasného výskumu. Nedávna identifikácia izoenzýmov TET, ako zdroja oxidovaných foriem 5-metylcytozínu, umožnila detailnejšie štúdium aktívneho demetylačného procesu DNA. Nakoľko metylačný status DNA je jedným z hlavných kontrolných mechanizmov epigeneticky regulovanej expresie génov, disregulácia enzymatickej aktivity TET je asociovaná s etiogenezou nádorových ochorení, ako napr. chronická myelomonocytárna leukémia. V tomto článku diskutujeme o enzymatickom mechanizme a funkcií proteínov TET v regulácii fyziologických bunkových procesov, ako aj o aktuálnych poznatkoch týkajúcich sa ich úlohy v karcinogenéze.

Kľúčové slová: 5-metylcytozín, 5-hydroxymetylcytozín, 5-formylcytozín, 5-karboxylcytozín, TET, aktívna demetylácia DNA

Úvod

Rakovina je všeobecný pojem pre veľkú skupinu ochorení charakterizovaných rastom abnormálnych buniek, ktoré potom môžu napadnúť susedné časti tela a rozšíriť sa do iných orgánov. V ekonomicky rozvinutých krajinách sú nádorové ochorenia druhou najčastejšou príčinou smrti a častou príčinou invalidity či vyradenia pacientov z aktívneho života, čo predstavuje veľký sociálny ale aj ekonomický problém [1]. Nádorové ochorenia vznikajú v dôsledku vrodených – genetických porúch, alebo vplyvom nezdravého životného prostredia či životného štýlu. Zatiaľ čo biologické, fyzikálne a chemické faktory životného prostredia môžu mať mutagénny efekt a teda iniciovať tvorbu mutácií na génovej úrovni, vplyv nezdravého životného štýlu, ktorý tiež zahŕňa nevyváženú stravu, sa prejaví na úrovni epigeneticky regulovanej expresii génov [2].

Epigenetické zmeny sú považované za jeden z molekulárnych mechanizmov, ktoré sa zúčastňujú na karcinogéze. Epigenetické „mutácie“ majú potenciál narušiť fyziologický bunkový fenotyp a to ovplyvnením génovej expresie niekoľkými spôsobmi, ktoré zahŕňajú metylácie cytozínových zvyškov DNA, kovalentné modifikácie histónov a nukleozómové polohovanie a teda aj štruktúru chromozómov. Epigenetika je definovaná ako dedičná zmena génovej expresie, ktorá nie je výsledkom zmien sekvencie DNA. Hlavnými epigenetickými mechanizmami sú:

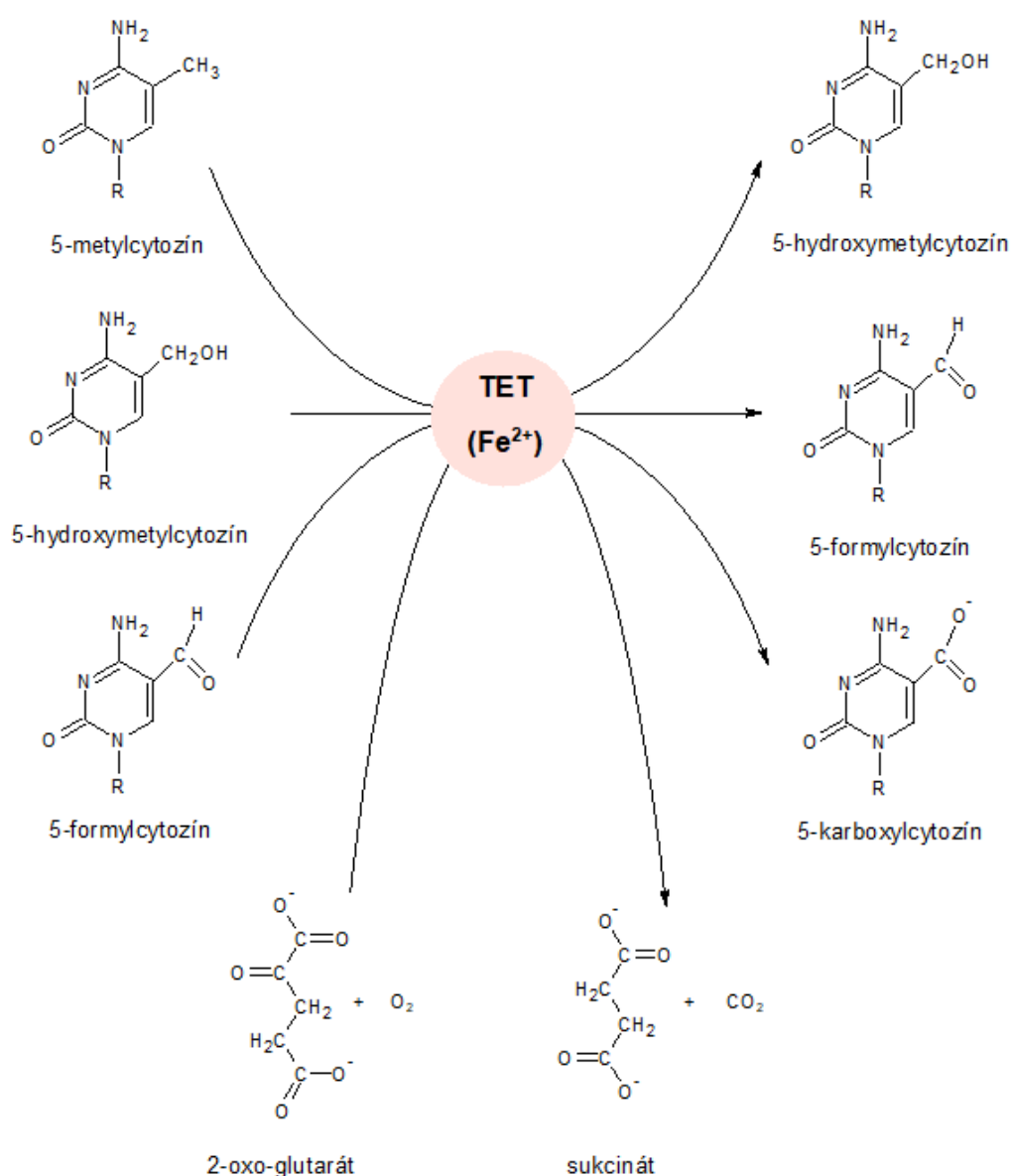
- a) **metylácia DNA**, ktorá je z časti dedičná. Najčastejšie sa uskutočňuje metylácia na cytozine za vzniku 5-metylcytozín (5mC), ale v ojedinelých prípadoch sa môže vyskytnúť metylácia aj na guaníne (7-metylguanín) alebo adeníne (3-metyladenín). V promótorových častiach v úsekoch CpG metylácia DNA spôsobí narušenie transkripčných procesov, takým spôsobom, že sa viaže na transkripčné faktory, a tým znižuje génovú expresiu. Pri metylácii napríklad cytozínu mimo promótorovej časti môže takáto zmena spôsobiť zvýšenie alebo zníženie génovej expresie. Metylácia DNA je sprostredkovaná pomocou štyroch izoenzýmov DNA-metyl-transferáz (DNMT): DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b [3, 4]. Demetylácia DNA sa môže uskutočniť dvomi spôsobmi a to buď pasívne alebo aktívne. Medzi pasívnu demetyláciu patrí deaminácia 5mC alebo 5hmC za pomoci enzýmu cytidíndeaminázy (AICDA) za vzniku 5hydroxymetyluracilu alebo tymidínu. Za aktívnu metyláciu sa považuje premena 5mC na 5-hydroxymetyl cytozín (5hmC) za pomoci enzýmu TET, na ktorý je zameraná naša práca [5].
- b) **modifikácie na históne**, pre ktoré sú typické hlavne acetylácie a metylácie histónov, ale patria sem aj ďalšie zmeny ako fosforylácia, ubikvinácia, hydroxylácia a sumoylácia. Tieto metylačné, acetylačné a iné kovalentné zmeny na histónoch spôsobujú konformačné zmeny, čím určujú dostupnosť DNA pre transkripciu [6].
- c) **mikroRNA (miRNA)** sú gény, ktoré sa skladajú maximálne z 22 nukleotidov a sú považované za gény, ktoré vplyvajú na tumor supresorové gény a onkogény, čím môžu spôsobiť nádorové ochorenia [7].

Deregulácia epigenetických procesov zohráva úlohu v etiopatogéze mnohých komplexných ochorení, vrátane rakoviny [8, 9]. Najmä metylácia DNA bola podrobne opísaná pri rôznych rakovinových ochoreniach [10]. Prostredníctvom týchto účinkov na genómovú stabilitu a génovú expresiu epigenetické zmeny ovplyvňujú karcinogézu od začiatku až po celú dobu života pacienta a v niektorých prípadoch sa prenášajú aj z generácie na generáciu [11]. Epigenetické zmeny, ktoré sú relevantne spojené so zvýšeným rizikom vzniku rakoviny, sa predpokladajú za potenciálne "prvé hity" pri nádorových ochoreniach. Epigenetické úseky odrážajú genetický kód jednotlivca a expozíciu tohto genetického kódu rôznym faktorom životného prostredia, čo má význam pre pochopenie vplyvu environmentálnych vplyvov na karcinogézu [12]. Pretože epigenetické zmeny sa vyskytujú pred alebo počas ranného vývoja nádoru, môžu byť modulované stravou, liekmi a inými vonkajšími faktormi [13]. Epigenetické zmeny v porovnaní s genetickými zmenami sú reverzibilné a postupne sa získavajú. Táto vlastnosť poskytuje obrovský potenciál pri stratégii prevencie rakoviny. Okrem toho sa ukázalo, že terapie zamerané na epigenetické mechanizmy zvyšujú alebo znižujú génovú expresiu a niektoré sa dajú využiť v klinickom výskume [14].

Enzymy TET

Metylácia cytozínových zvyškov DNA je jedným z epigenetických mechanizmov spolupodieľajúcich sa na inhibícii génovej exprese. Opätovná reaktivácia takto deaktivovaného génu si vyžaduje buď odstránenie 5-metylcytozínového (5mC) zvyšku z DNA, alebo jeho metabolickú konverziu.

Enzymatickou premenou 5-metylcytozínu pomocou reakcie katalyzovanej enzýmom TET vzniká 5-hydroxymetylcytozín (5hmC), ktorý na rozdiel od 5-metylcytozínu nemá inhibičný účinok na iniciáciu transkripcie génov. Enzým TET má 3 izoformy a to: TET1, TET2 a TET3 [15,16]; a všetky patria do rodiny na 2-oxoglutaráte závislých dioxygenáz. TET enzýmy oxidujú 5mC na 5hmC, ktorý môže byť následne oxidovaný na 5-formylcytozín (5fC) alebo 5-karboxylcytozín (5caC) (Obrázok 1). Donorom elektrónov pre oxidáciu metylovej skupiny 5mC prostredníctvom radikálovej substitúcie je 2-oxoglutarát a koenzýmom je Fe^{+II} . [15,17]. Nakoľko TET enzýmy sú dioxygenázy, zdrojom kyslíka je O_2 [16]. Enzymatická aktivita TET enzýmov môže byť stimulovaná pomocou ATP a vitamínu C, alebo inhibovaná prostredníctvom 2-hydroxyglutarátu [18].



Obrázok 1. Schéma oxidácie 5- metylcytozínového, 5-hydroxymetylcytozínového a 5-formylcytozínového zvyšku DNA pomocou TET enzýmu. Kosubstrátmi pre enzymatickú reakciu katalyzovanú TET sú 2-oxoglutarát a molekulový kyslík.

Oxidácia 5mC na 5hmC pomocou TET enzýmov je dôležitá pre zachovanie fyziologického stavu buniek a tiež organizmu. V súlade s týmto predpokladom sú výsledky pozorovaní poklesu zastúpenia 5hmC zvyškov v genómovej DNA u pacientov s rakovinou, pričom ich pokles koreluje so závažnosťou ochorenia, ako aj pozorovaní, že u pacientov s vrodenou, geneticky podmienenou, poruchou TET enzýmov je zvýšený výskyt vývojových zlyhaní [19], ako aj výskyt chronickej myelomonocytárnej leukémie (CMML), akútnej myeloidnej leukémie a sekundárnej AML. Stanovenie prítomnosti 5hmC v DNA sa v súčasnosti javí ako jeden z diagnostických a prognostických parametrov pre myeloidné malígne ochorenia, vďaka ktorým by bolo možné vyhodnotiť reakciu pacientov na protirakovinové lieky následne personalizovať ich terapiu [20]

Onkometabolit 2-hydroxyglutarát – inhibítor TET aktivity

Izocitrátdehydrogenáza (IDH) je enzým zodpovedný za oxidačnú dekarboxyláciu izocitrátu na 2-oxoglutarát. U pacientov s malígnymi nádormi bola pozorovaná expresia mutantných foriem IDH, ktoré katalyzovali tvorbu 2-hydroxyglutarátu, redukovaný ekvivalent 2-oxoglutarátu. Takto vzniknutý 2-hydroxyglutarát je kompetitívny inhibítor všetkých 2-oxoglutarát-závislých dioxygenáz, vrátane enzýmov TET [25,26]. Preto je možné predpokladať, že nádorové bunky v takomto prípade ovplyvňujú epigeneticky regulovanú expresiu génov prostredníctvom svojho pozmeneného metabolizmu.

Záver

Počas posledných rokov sa zaznamenal pozoruhodný pokrok v pochopení úlohy TET enzýmov pri regulácii metylácie / demetylácie DNA. Vplyvom oxidácie 5mC môžu TET enzýmy podporovať demetyláciu DNA, hlavne v promótorových oblastiach génu, čo spôsobí zvýšenú génovú expresiu. Rozsiahle štúdie stanovili TET2 ako často mutovaný gén v hematologických karcinómoch a podporili myšlienku, že nedostatok oxidácie 5mC, ktorá sa vyskytuje v dôsledku straty funkcie TET2 enzýmu, predurčuje vývoj hematologických malignít myeloidného a lymfoidného pôvodu. Základná otázka však zostáva nezodpovedaná – ako dochádza ku strate funkcie TET2 enzýmu? Je potrebné, aby budúce štúdie boli nasmerované na objasnenie základných molekulárnych mechanizmov.

Okrem hematopoetického systému sa zdá, že malígna transformácia je vo všeobecnosti spojená so znížením hladín genómových 5hmC v rôznych tkanivách [27, 28]. Preto by bolo veľmi dôležité posúdiť vzťah medzi mutáciami TET a vývojom nehematopoetických rakovín. Ďalej by bolo zaujímavé určiť, či je kvantifikácia 5hmC užitočná ako diagnostický alebo prognostický nástroj pri rakovine a či manipulácia aktivity TET malými molekulami alebo inými modulátormi môže byť použiteľná na terapiu rakoviny.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] WHO, <http://www.who.int/cancer/en/> 2018 [2018-10-02]
- [2] Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011 Sep 23;11(10):726-34.
- [3] Guo JU, Su Y, Shin JH, Shin J, Li H, Xie B, Zhong C, Hu S, Le T, Fan G, Zhu H, Chang Q, Gao Y, Ming GL, Song H. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*. 2014 Feb;17(2):215-22.
- [4] Barciszewska AM. Global DNA demethylation as an epigenetic marker of human brain metastases. *Biosci Rep*. 2018 Sep 25 pii: BSR20180731.
- [5] Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P.D., Rogers, J., 2011. Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32, 1161–1180.

- [6] Sassone-Corsi P. Physiology. When metabolism and epigenetics converge. *Science*. 2013 339, 148–150.
- [7] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006 6:857–866.
- [8] Jones P. Out of Africa and into epigenetics: discovering reprogramming drugs. *Nat Cell Biol* 2011;13:2.
- [9] Feinberg AP. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease. *Virchows Archiv* 2010;456:13–21.
- [10] Khare S, Verma M. Epigenetics of colon cancer. *Methods Mol Biol* 2012;863:177–85.
- [11] Brasset E, Chambeyron S. Epigenetics and transgenerational inheritance. *Genome Biol* 2013;14:306.
- [12] Wild CP, Scalbert A, Herceg Z. Measuring the exposome: a powerful basis for evaluating environmental exposures and cancer risk. *Environ Mol Mutagen* 2013;54:480–99.
- [13] Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol* 2012;41:79–105.
- [14] Verma M. Cancer control and prevention: nutrition and epigenetics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16:376–84.
- [15] Ito S, Shen L, Dai Q, Wu, SC, Collins, LB, Swenberg, JA, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 2011 333: 1300-1303.
- [16] He YF, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song C-X, Zhang K, He C, Xu G-L. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 2011 333: 1303-1307.
- [17] Tahiliani M, Koh K P, Shen Y, Pastor W A, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer L M, Liu D R, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009 324: 930-935.
- [18] Blaschke K, Ebata K T, Karimi M M, Zepeda-Martinez J A, Goyal P, Mahapatra S, Tam A, Laird D J, Hirst M, Rao A, Loricz M C, Ramalho-Santos M. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* 2013 500: 222-226.
- [19] Gu T-P, Guo F, Yang H, Wu H-P, Xu G-F, Liu W, Xie Z-G, Shi L, He X, Jin S, Iqbal K, Shi Y G, Deng Z, Szabo P E, Pfeifer G P, Li J, Xu G-L. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 2011 477: 606-610.
- [20] Ko M, Huang Y, Jankowska A M, Pape U J, Tahiliani M, Bandukwala H S, An J, Lamperti E D, Koh K P, Ganetzky R, Liu X S, Aravind L, Agarwal S, Maciejewski J P, Rao A. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 2010 468: 839-843.
- [21] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466:1129–33.
- [22] Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunliffe K, Nardone J, et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8:200–13.
- [23] Lorschach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia*. 2003;17:637–41.
- [24] Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468:839–43.
- [25] Chowdhury R, Yeoh KK, Tian YM, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR, Leung IK, Li XS, Woon EC, Yang M, McDonough MA, King ON, Clifton IJ, Klose RJ, Claridge TD, Ratcliffe PJ, Schofield CJ, Kawamura A. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep*. 2011 May;12(5):463-9.
- [26] Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, Xiong Y. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011 Jan 18;19(1):17-30.
- [27] Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, Esopi DM, Gerber J, Pellakuru LG, Toubaji A, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Nelson WG, Netto GJ, De Marzo AM, Yegnasubramanian S. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget*. 2011 Aug;2(8):627-37.
- [28] Kraus TF, Globisch D, Wagner M, Eigenbrod S, Widmann D, Münzel M, Müller M, Pfaffeneder T, Hackner B, Feiden W, Schüller U, Carell T, Kretzschmar HA. Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors. *Int J Cancer*. 2012 Oct 1;131(7):1577-90.

REGULÁCIA VÝZNAMNÝCH APOPTOTICKÝCH DRÁH PRI SPÚŠŤANÍ NÁDOROVÝCH PROCESOV

J. Hatok¹, Z. Majerčíková¹, V. Fialková^{1,2} a P. Račay³

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)

²Výskumné centrum AgroBioTech, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra

³Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine

Korešpondujúca osoba:

doc. RNDr. Jozef Hatok, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Ústav lekárskej biochémie

Malá Hora 4D - 036 01 Martin – SK

E-mail: hatok@jfmed.uniba.sk

Abstrakt

Apoptóza je jedna z hlavných typov bunkovej smrti predstavujúca fyziologický proces pri odstraňovaní poškodených buniek. Samotný mechanizmus apoptózy je spúšťaný kaskádou biochemických signálov, pričom rozlišujeme dve hlavné dráhy aktivácie a to vonkajšiu i vnútornú. Avšak, nesprávna regulácia apoptózy je jednou z hlavných príčin nekontrolovanej bunkovej proliferácie, ktorá môže prispievať k vzniku terapeutickú rezistencie a progresii nádorových chorôb. V tomto príspevku poukazujeme na významné molekuly a ich signály spájané s apoptotickou bunkovou smrťou ako aj ich vzájomnú reguláciu pri malígnych procesoch.

Kľúčové slová: apoptóza, regulácia, malignity

Úvod

Molekulárne mechanizmy apoptózy, najmä na úrovni aktivácie, sú rôznorodé. Aj keď znalosť detailných signálnych dráh, ktoré spúšťajú apoptózu nie je kompletne známa, tento proces je kontrolovaný veľkým počtom komplexov proteínov. Dané komplexy sú aktivované rôznymi spúšťačmi, zoradenými v sekvenčných moduloch [1]. Podľa súčasných poznatkov je apoptóza aktivovaná dvomi hlavnými dráhami: **vonkajšou** (receptorová) a **vnútornou** (mitochondriálna).

Vonkajšia dráha, niekedy tiež označovaná ako receptorová alebo cytoplazmatická je spúšťaná cez Fas smrtiaci receptor, ktorý patrí do rodiny receptorov tumor nekrotizujúceho faktora (TNF) [2]. Vnútorná alebo mitochondriálna dráha, ktorá po stimulácii vedie k uvoľneniu cytochrómu-c z mitochondrií a tým aktivuje smrtiace signály, je označovaná za druhú. Obidve dráhy konvergujú do spoločnej koncovej dráhy proteáz. Aktivácia kaskády proteáz, nazývaných kaspázy, vedie k proteolytickej degradácii regulačných a štrukturálnych proteínov a nakoniec vyústi do bunkovej smrti [1].

Vonkajšia dráha

Vonkajšia apoptotická dráha zahŕňa niekoľko proteínových skupín, akými sú receptory smrti, na membránu viazané Fas ligandy, komplexy Fas, Fas-asociovaná smrtiaca doména i efektorové kaspázy-8 a -10, ktoré aktivujú výkonné kaspázy [1]. Vonkajšia dráha apoptózy je iniciovaná rôznymi typmi signálov, ktoré môžeme rozdeliť do troch skupín [3]:

- i. indukcia prostredníctvom TNF receptora;
- ii. signalizácia cez Fas receptor;
- iii. indukcia formou ligandu TRAIL.

V prvom type sa väzbou ligandu TNF na receptor spúšťa väzba cytoplazmatického proteínu na cytoplazmatickú časť receptora. Aktivácia receptora TNFR1 vedie k formovaniu komplexu TRADD-RIP-TRAF2, ktorý signalizuje prostredníctvom NF- κ B dráhu prežívania alebo cez JNK (c-Jun-N-terminálnu kinázu) dráhu k navodeniu smrti. Práve receptor interagujúci proteín (RIP) spúšťa do činnosti prokaspázu-2 a tým sa rozštiepi proteín Bid na skrátenú formu tBid. Bid je tiež modifikovaný aj cez molekulu JNK (aktivovaná DAXX proteínom), ktorá umožní jeho translokáciu do mitochondrie vo forme jBid, čím sa uvoľní druhý mitochondriálny aktivátor kaspáz SMAC/DIABLO. Komplex formovaný adaptorovým proteínom FADD (TRADD-FADD-FLICE), prostredníctvom interakcie DD domén, aktivuje prokaspázu-8, ktorá sa autokatalyticky aktivuje za vzniku aktívnej kaspázy-8 (obr. 1). Tá následne spúšťa aktiváciu kaspázovej kaskády cez kaspázu-3. Kaspázová kaskáda je uvedená nižšie, ako koncová dráha apoptózy.

Môžeme povedať, že aktiváciu vonkajšej dráhy reguluje niekoľko ďalších dráh a proteínových molekúl. Dysregulácia týchto modulátorov vonkajšej dráhy predpokladá vznik malígnych transformácií, akými sú mutácie alebo delécie *Fas* génu, resp. celej receptorovej dráhy [4]. Medzi regulátory spomínanej dráhy patria transkripčný faktor NF κ B a aktivačný proteín 1 (AP1), ktoré pôsobia priamo na *FasL* gén – transkripčne inaktívovaný gén [5].

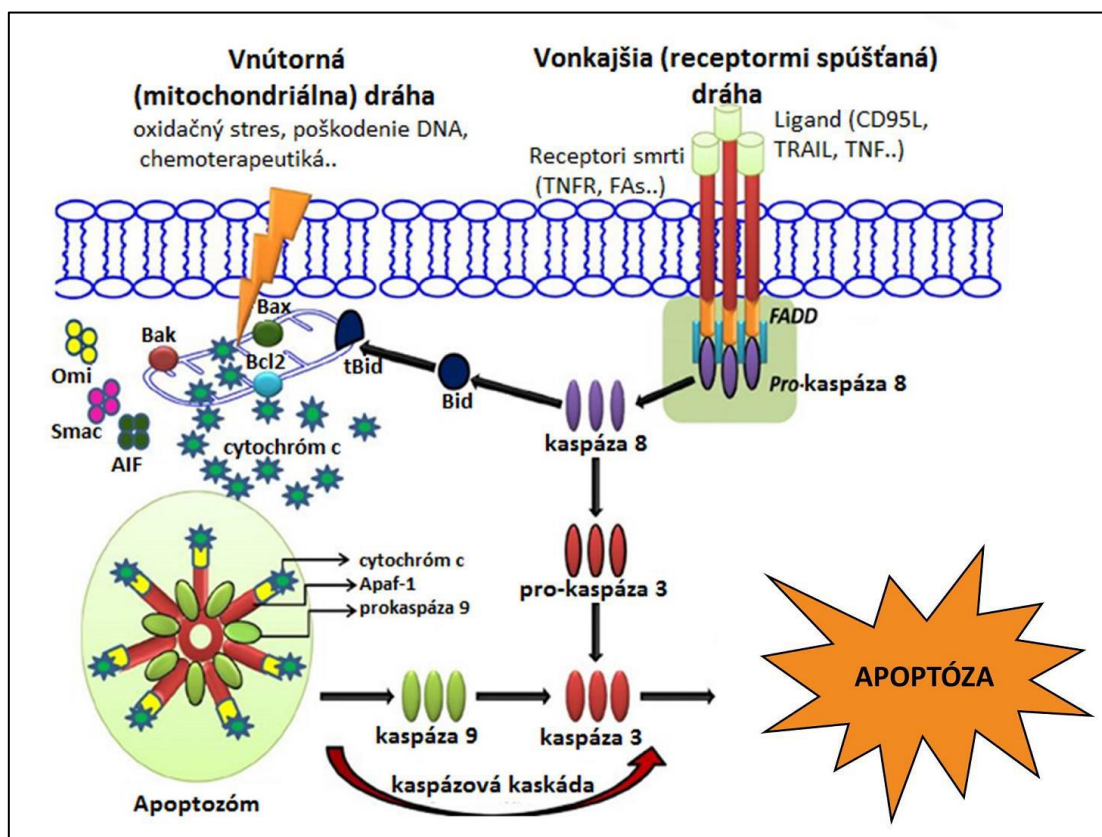
Vnútorná dráha

Pri vnútornej, alebo tiež označovanej mitochondriálnej dráhe môžeme hovoriť, že je aktivovaná dvomi spôsobmi. Permeabilizáciou vonkajšej mitochondriálnej membrány, ktorá môže byť navodená rôznymi udalosťami alebo priamym poškodením jadrovej DNA vplyvom metabolitov, toxínov, voľnými radikálmi a ich derivátmi. V prípade poškodenia DNA zohráva dôležitú úlohu gén *p53* a ním kódovaný rovnomenný proteín. Dominantou pri mitochondriálnej vnútornej signálnej dráhe je cytochróm-c, ktorý sa uvoľní do cytoplazmy, kde spúšťa radu následných krokov [7].

Dráha je regulovaná relatívnou koncentráciou Bcl-2 podobných proteínov vo vnútornej mitochondriálnej membráne. Tie kontrolujú translokáciu určitých proteínov z mitochondriálneho matrix (endonukleáza G) a medzimembránového priestoru (cytochrómu-c) do cytoplazmy. U ľudí existuje okolo 24 rôznych Bcl-2 podobných proteínov (tab. 1), ktoré možno rozdeliť do nasledujúcich skupín:

- i. antiapoptotické proteíny ako Bcl-2 a Bcl-xL;
- ii. proapoptotické proteíny ako Bax a Bak, ktoré sú nevyhnutné pri formovaní pórov;

iii. proapoptotické proteíny ako Bid, Bad, PUMA a Noxa, ktoré podporujú vznik pórov.



Obrázok 1: Zjednodušená schéma vonkajšej a vnútornej dráhy apoptózy. Vonkajšia apoptotická dráha je spúšťaná väzbou ligandov na príslušné receptory smrti, čo vedie k aktivácii kaspázy 8/10, ktorá štiepi proteín Bid na skrátenú formu tBid. Takto sa vonkajšia dráha apoptózy napája na vnútornú (mitochondriálnu) dráhu. Aktivovaná kaspáza 8/10 vedie k aktivácii kaspázovej kaskády. Vplyvom rôznych stresových stimulov sa aktivuje vnútorná apoptotická dráha, pri ktorej pro-apoptotické proteíny Bax a Bak oligomerizujú a zvyšujú priepustnosť vonkajšej mitochondriálnej membrány. Z mitochondrie uvoľnený cytochróm c interaguje s aktivačným faktorom proteázy (Apaf-1), pro-kaspázou 9 a formuje apoptozóm. To vedie k aktivácii kaspázy 9, ktorá štiepi a aktivuje efektorové kaspázy vedúce k apoptóze bunky. Apoptózu podporujú ďalšie faktory, ktoré sa uvoľňujú z mitochondrie neskôr (Smac, Omi, AIF) a prispievajú k apoptotickému fenotypu bunky [Prevzaté z dizertačnej práce: Čapláková V., 2017].

Vnútna dráha začína v mitochondriách na základe rôznych podnetov. Membránová permeabilizácia je sprostredkovaná výlučne BH3 proteínmi, ktoré udržiavajú a inhibujú mitochondriálnu translokáciu Bax a následne uvoľnenie cyt-c, SMAC/DIABLO, AIF a HTRA2/OMI. Antiapoptotické proteíny Bcl-2 a Bcl-xL zabraňujú úniku cyt-c a tým bunkovej smrti kompetitívnou väzbou na Bak a Bax, čím znemožňujú vytváranie pórov v mitochondriálnej membráne ich vzájomnou oligomerizáciou. Vylúčením cyt-c cez póry vytvárané vo vonkajšej mitochondriálnej membráne Bcl-2 podobnými proapoptotickými proteínmi (Bax a Bad) je apoptóza aktivovaná (obr. 1). To znamená, že Bax/Bak vonkajšiu membránu permeabilizujú, čo vedie k „vylitiu“ ďalších apoptogénnych proteínov a otvoreniu veľkých iónových kanálov vo vnútornej i vonkajšej mitochondriálnej membráne. Následne dochádza k prúdeniu molekúl vody so spojením straty iónovej nerovnováhy na membráne. Mitochondria tak „bobdnú“, stráca svoj potenciál, vnútorná membrána praská a dochádza k uvoľneniu matrix do cytoplazmy bunky. Celý tento proces vedie k smrti bunky vďaka uvoľneniu mitochondriálnych proteínov do cytoplazmy, čo spúšťa kaskádu ďalších dejov a taktiež strátu základnej úlohy mitochondrie, teda produkcie ATP v dýchacom reťazci [7].

Tabuľka 1: Rozdelenie proteínov Bcl-2 rodiny podľa ich funkčnosti.

PROAPOPTOTICKÉ		ANTIAPOPTOTICKÉ
s BH-3 doménou	s multidoménou (BH)	
Bik	Bax	Bcl-2
Bad	Bak	Bcl-xL
Bim	Bok	Bcl-W
Hrk	Boo	
Hr	Bcl-B	Mcl-1
NOXA	Bcl-RAMBO	
PUMA	Bcl-xS	Bfl-1
+ ďalšie		+ vírusové homológy

Cytochróm-c sa v cytoplazme naviaže na APAF1, čím sa vytvorí apoptozóm, ktorý konvertuje prokaspázu-9 na kaspázu-9 a tá následne aktivujú kaspázy -3 a -7. Kaspáza-3 štiepi svoje substráty, pričom dochádza k deštrukcii cytoskeletu a aktivácii rôznych enzýmov. Typickým príkladom je indukcia kaspázou aktivovanej DNázy (CAD – caspase-activated DNase), ktorá je zodpovedná za štiepenie genómovej DNA, prostredníctvom proteolytickej degradácie inhibítora kaspázou aktivovanej DNázy (ICAD) [8]. Ďalej, SMAC/DIABLO cez IAP (antiAP proteíny zastavujúce apoptózu inhibíciou aktivovaných kaspáz) potláča spustenie kaspázovej kaskády. Uvoľnenie AIF z mitochondrie spôsobuje degradáciu DNA prostredníctvom PARP1 (poly ADP-ribóza polymeráza-1). AIF má teda nepriamu úlohu pri chromozómovej degradácii.

Môžeme povedať, že jednými z najdôležitejších regulátorov vnútornej dráhy sú proteíny Bcl-2 rodiny. Zvýšená expresia Bcl-2 zapríčiňuje rezistenciu na chemoterapeutiká a radiačnú liečbu, zatiaľ čo znížené hladiny Bcl-2 môžu podporovať apoptotické odpovede na chemoterapeutickú liečbu. Zvýšená expresia Bcl-2 sa navyše môže akumulovať v bunkách počas G0 fázy úseku bunkového cyklu a tým prispievať ku chemorezistencii [9].

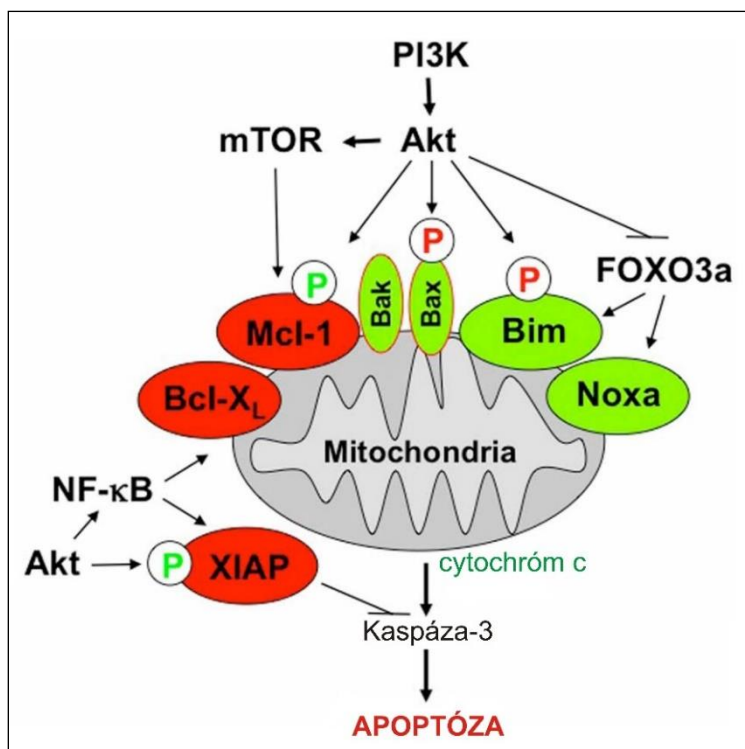
Kaspázová koncová dráha

Kaspázy sú proteíny s proteolytickou aktivitou, ktoré vykazujú pomerne širokú substrátovú špecificitu a štiepia viaceré cytoplazmatické proteíny. Kaspázová kaskáda zahŕňa efektorové kaspázy (kaspáza-8, kaspáza-9, kaspáza-10), ktoré proteolyticky aktivujú výkonné kaspázy (kaspáza-3, kaspáza-6, kaspáza-7). Výkonné kaspázy štiepia svoje cytoplazmatické substráty, čo vedie k rozvinutiu apoptózy. Medzi ich substráty patria najmä štrukturálne proteíny (napr. fodrin, G-aktín), proteíny zúčastňujúce sa prenosu bunkových signálov (napr. proteín kináza C) a proteíny bunkového cyklu a opráv DNA (napr. Mdm-2). Kaspáza-8 okrem aktivácie výkonných kaspáz proteolyticky aktivuje aj Bid, ktorý podporuje vznik pórov v mitochondriálnej membráne, a tým napomáha iniciácii mitochondriálnej dráhy apoptózy [8].

Vonkajšia a vnútorná dráha konvergujú až pri kaspáze-3, ktorá štiepi inhibítora kaspázou aktivovanej DNázy (ICAD), čím sa stáva CAD aktívna a spúšťa jadrovú apoptózu. Obidve signálne dráhy sú prepojené aj cez kaspázu-8, ktorá je síce dominantná kaspáza vonkajšej dráhy, ale môže byť regulovaná i vlastným „výkonným“ enzýmom apoptózy, kaspázou-6. Podľa *in vivo* štúdie môže byť kaspáza-6 hlavným aktivátorom kaspázy-8, keďže jej inhibícia výrazne znížila aktivitu kaspázy-8 a ovplyvnila celkové naštartovanie apoptózy [10]. Iniciácia kaspáz spôsobí degradáciu proteínkináz, cytoskeletálnych proteínov a proteínov zodpovedných za opravu DNA. Ďalej spúšťa podjednotky endonukleáz a nakoniec zničí „housekeeping“ bunkové funkcie. Kaspázy majú taktiež vplyv na cytoskeletálnu štruktúru, reguláciu bunkového cyklu, signálne dráhy, čo sa v konečnom dôsledku prejavuje morfológickými zmenami, akými je kondenzácia a fragmentácia DNA, resp. napučovanie membrány [11].

Dráha PI3K/AKT/mTOR

Dráha PI3K/AKT/mTOR reprezentuje kľúčovú transdukčnú dráhu pre bunkový rast a blokáciu bunkovej smrti. Abnormálne vysoká aktivácia PI3K/AKT/mTOR kaskády je charakteristickým znakom veľkej variability pri ľudských malignanciách a je spájaná s karcinogézou, nádorovou progresiou, rezistenciou na liečbu a taktiež zlou prognózou [12]. Vázba ligandov rastových faktorov na ich receptory je výsledkom angažovania kaskády prežívania a proliferácie vo vnútrobunkovom priestore. Spúšťačím mechanizmusom je odpoveď na fosforyláciu receptorovej tyrozín kinázy, nachádzajúcej sa vo vnútri plazmatickej membrány. Pozitívnym regulátorom tejto signálnej dráhy je tumor supresorový gén *PTEN*, ktorý má charakter lipidovej a zároveň aj proteínovej fosfatázy [13]. Tumor supresorový gén *PTEN* môže defosforylovať PIP3, čím zablokuje transdukčný signál PI3/Akt.



Obrázok 2: Schéma signálnej PI3K/AKT/mTOR dráhy. Kľúčovú signalizáciu zohráva AKT, svojim priamym aj nepriamym pôsobením na apoptotické proteíny. Upravené podľa [14].

Pri tejto dráhe má kľúčovú úlohu proteín AKT, ktorý má charakter antiapoptotického faktora priamo alebo nepriamo antagonizujúceho bunkovú smrť [15]. Priamo bol AKT spájaný s fosforyláciou kľúčových apoptózu regulujúcich proteínov (obr. 2), čoho výsledkom je posun rovnováhy medzi pro- a antiapoptotickými proteínmi vedúcej k inhibícii bunkovej smrti [14]. S touto rovnováhou bolo poukázane na multidoménný proteín Bax, ktorý je fosforylovaný Akt-závislým spôsobom na serínovom zvyšku v pozícii 184 [16]. Okrem tejto konformačnej zmeny Bax blokuje AKT aj aktivitu proteínu Bim. Zatiaľ čo fosforylácia proapoptotických proteínov Bax a Bim zmierňuje ich potenciál. Naopak, AKT-sprostredkovaná fosforylácia niektorých aAP faktorov (XIAP a Mcl-1) znižuje ich antiapoptotické vlastnosti znížením ich proteínovej stability. Výsledkom tejto degradácie cez proteázomovú mašineriu je redukcia proteínovej expzie. Za nepriame pôsobenie Akt na bunkovú smrť je považovaná cesta fosforylácie transkripčných faktorov. Tento mechanizmus platí pri faktore NFκB a cAMP element-viažúcom proteíne (CREB) ako aj faktoroch, ktoré sa označujú FOXO („Forkhead box“ trieda O). AKT fosforylačná stimulácia môže na jednej strane podporovať expziu antiAP proteínov, kým na druhej strane redukuje hladiny proapoptotických proteínov [14].

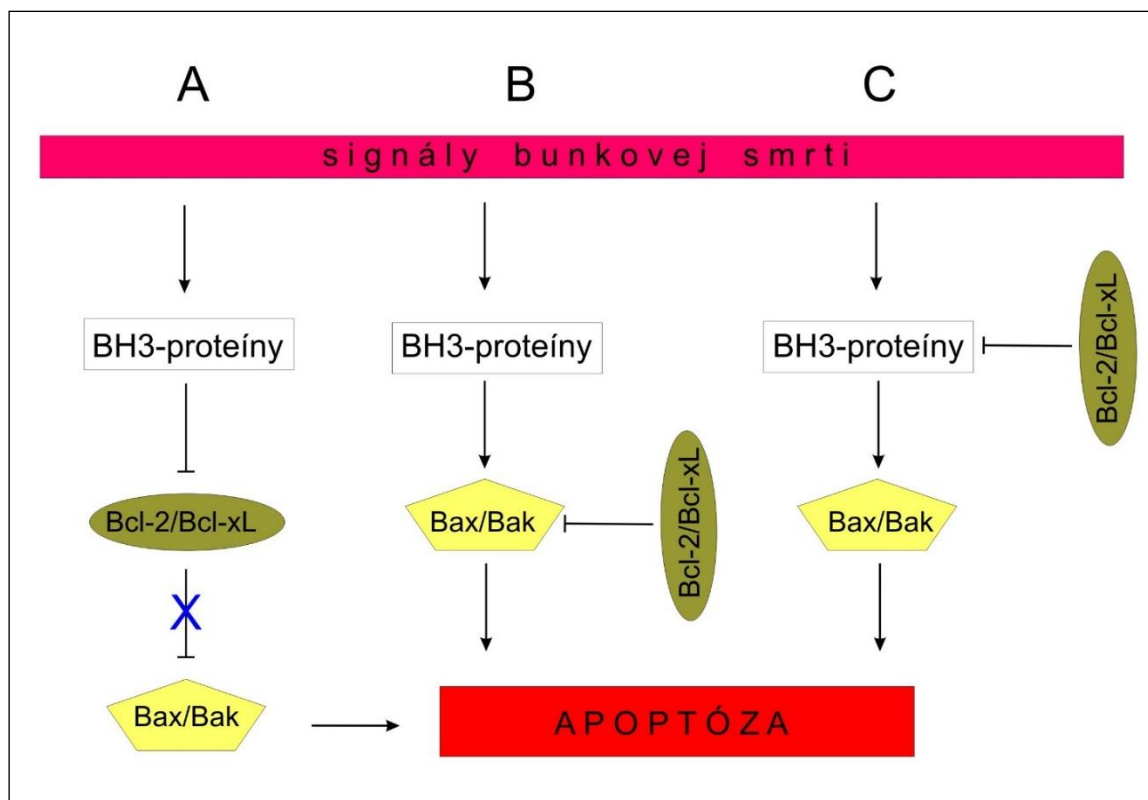
Signálna dráha PI3K/AKT/mTOR reprezentuje regulačný mechanizmus na kontrolu aktivity pro- a antiapoptotických proteínov rodiny Bcl-2, preto objavenie malých molekulových inhibítorov tejto kaskády môžu otvoriť nové perspektívy pri modelovaní mitochondriálnej dráhy apoptózy.

Regulácia apoptózy a jej úloha pri nádoroch

Problémy s reguláciou apoptózy sú prítomné vo veľkom počte ochorení, nádorové choroby nevynímajúc. Pre nádorové bunky je typické veľké množstvo mutácií, ktoré umožňujú ignoráciu regulačných signálov pre rast a proliferáciu zdravej bunky. Za normálnych okolností poškodené bunky podliehajú apoptóze, ale v prípade mutácií v nádorových bunkách sa môže stať, že tieto bunky nepodstúpia apoptózu. V takýchto stavoch bunková proliferácia nie je kontrolovaná, v dôsledku čoho môže byť daná porucha progresom k formovaniu nádorov. Vo väčšine prípadov je tieto nádory obtiažne vyliečiť pomocou protinádorových liečiv, keďže mutácie v apoptotickej dráhe spôsobia produkciu buniek, ktoré sú rezistentné na tento typ ataku. Preto pochopenie regulácie apoptózy v nádorových bunkách je v súčasnosti významným zameraním pri určovaní cielej terapie [8].

Apoptotická kaskáda je veľmi prísne regulovaná. V jej priebehu existujú body, v ktorých sa môžu uplatniť rôzne kontrolné mechanizmy: aktivácia či inaktivácia enzýmov, alebo tiež mieru aktivácie rôznych pro- a anti-apoptotických proteínov. Obidve hlavné dráhy apoptózy sú regulované spoločnými proteínmi, medzi ktoré vo väčšej miere patria: p53, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, NFκB, Myc, AKT a PI3K. Práve vzájomný pomer hladín pro- a antiapoptotických zložiek tak predurčuje definitívny osud bunky. Presný mechanizmus, ako spomínané proteíny regulujú apoptózu nie je známy, existujú však tri modelové situácie, ktoré sú v tejto súvislosti najčastejšie definované (obr. 3):

- A. V prvom modeli sú Bax a Bak udržiavané v neaktívnej formácii cez priamu interakciu s jedným alebo dvomi rozdielnymi aAP Bcl-2 proteínmi. V odpovedi na apoptotický stimul sa BH3-výhradné proteíny viažu a neutralizujú aAP proteíny, výsledkom čoho je uvoľnenie Bax a Bak. Zvýšená expresia Bcl-2 a Bcl-xL predstavuje zablokovanie Bax translokácie a aktivácie [17]. Úloha proteínu Bak je demonštrovaná pri odlúčení Bcl-xL a Mcl-1 v mitochondriách za normálnych podmienok [18]. Navyše BH3 proteíny zohrávajú centrálnu úlohu pri špecifických väzbách na antiapoptotických členov Bcl-2 rodiny. Napríklad, Bad interaguje s Bcl-2 a Bcl-xL, ale nie s Mcl-1 na ktorý sa viaže Noxa, ktorý však nie je špecifický pre väzbu s Bcl-2 a Bcl-xL [19]. Tieto prepojenia indikujú, že na spustenie smrteľného stimulu sa musí aktivovať viac než len jeden proteín s BH3 doménou. Willis a kolektív dokázali, že uvoľnenie Bak z Bcl-xL a Mcl-1 vyžaduje zvýšenú expresiu oboch proteínov Bad a Noxa. Pri samostatnej aktivácii Bad resp. Noxa proteínu tento efekt nebol pozorovaný. Naopak nadexpresia proteínu Puma, ktorý má vysokú afinitu na väčšinu aAP proteínov, je dostatočná na indukciu Bak sprostredkovanej apoptózy [18].
- B. Druhou alternatívou pri BH3 proteínoch je ich priamy účinok na Bax a Bak. Zaznamenaná bola priama interakcia tBid a Bim s Bax. Fluorescenčné značenie Bax a tBid nepoukázalo na ich vzájomnú kolakiláziu počas apoptózy. Bax sa nachádza v klastroch na mitochondriách [20].
- C. Tretím modelom je návrh, že aAP Bcl-2 členovia izolujú BH3 proteíny formou zabránenia aktivácie pAP proteínov Bax a Bak.



Obrázok 3: Modely regulácie hlavnej apoptotickej dráhy. Prevzaté z práce Hatok J., 2016 [21].

Je zrejmé, že tieto modely ukazujú, že Bcl-2 proteíny sú pravdepodobne regulované niekoľkými mechanizmami, ktoré sa môžu líšiť podľa typu buniek ako aj v rovnakej bunke, ale pri rôznych podnetoch. Zvýšená expresia Bcl-2 vo vnútornej dráhe môže viesť k inhibícii apoptózy, sprostredkovanvej vonkajšou dráhou. Naopak, TNF α môže zvýšiť expresiu NF κ B a stimulovať tak antiapoptotické proteíny Bcl-2 rodiny [1].

Mnohé chorobné stavy vznikajú v dôsledku poruchy regulácie apoptózy jednak jej nadmernou indukciou (napr. neurodegeneratívne ochorenia, alebo AIDS) alebo naopak jej regresiou (napr. malignity spojené s mutáciou p53 alebo nadprodukciou viacerých antiAP proteínov). Nádorové postihnutie je všeobecný názov pre skupinu chorôb spôsobených nekontrolovaným množením nádorových buniek v najrôznejších telových orgánoch a tkanivách. Vzniká v dôsledku akumulácie mutácií v dôležitých regulačných génoch organizmu. Je charakterizované vznikom zhubných (malígnych) buniek, ktoré získali schopnosť prenikať do okolitých tkanív (invázia), kde tvoria vzdialené nádory (metastázy). Toto je klinická definícia zhubného nádoru. Keďže nádorové ochorenie vzniká akumuláciou genetických zmien v bunkových génoch, je logické, že ich s predlžovaním veku pribúda [22].

Nádorové bunky sa často vyznačujú vlastnosťami, ktoré poukazujú na poruchy v molekulových dráhach, ktoré vedú k prirodzenej apoptóze. Medzi typické poruchy, ktoré sa vyskytujú v nádorových bunkách, patria:

- ♦ zvýšená expresia prirodzených inhibítorov apoptózy, ako sú produkty génov *Bcl-2* a *Bcl-xL*,
- ♦ znížená expresia apoptózu indukujúcich proteínov Bax a Bid,
- ♦ inaktivácia nádorového supresorového génu *p53* genetickou mutáciou,
- ♦ inhibícia signálnej dráhy sprostredkovaná rodinou faktorov nádorovej nekrózy (TNF), dráhou TRAIL a neprítomnosťou receptora smrti Fas,
- ♦ aktivácia signálnej dráhy AKT/PKB (upregulácia Bcl-2),
- ♦ aktivácia inhibítorov apoptotických bielkovín (IAP) [22].

Záver

K prežitiu a proliferácii potrebujú malígne bunky prekonať množstvo bariér, ktoré by inak navodili ich smrť a preto ovplyvňujú viacero mechanizmov, resp. viacero biochemických dráh súčasne. Pravdepodobne všetky typy nádorov majú schopnosť nadobudnúť odolnosť voči programovanej smrti bunky. Nádorové bunky získavajú rezistenciu na apoptózu vďaka nadmernej aktivácii antiapoptotických proteínov alebo mutáciou, či zníženou aktiváciou proapoptotických proteínov. Vzhľadom na početnosť daných spôsobov preklenutia bunkovej smrti sa uvažuje, že látky, ktoré môžu globálne zmeniť apoptotickú rezistenciu nám môžu poskytnúť najcennejšie terapeutické výhody liečby rakoviny. Aby sme mohli nádorové bunky zacieliť najefektívnejšie, musíme ďalej objasňovať mechanizmy, ktorými sa bunky vyhýbajú apoptotickému programu.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(3): 178-94.
- [2] Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, et al. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem.* 2001; 276: 24242-24252.
- [3] Ghatage D, Gosavi S, Ganvir S. Apoptosis (Molecular Mechanism). LAP LAMBERT Academic Publishing, Germany. 2014.
- [4] Tognon R, Gasparotto EP, Leroy JM, Oliveira GL, Neves RP, Carrara Rde C, Kashima S, Covas DT, Santana M, Souto EX, Zanichelli MA, Velano CE, Simões BP, Alberto FL, Miyashiro K, de Souza AM, Amarante-Mendes GP, de Castro FA. Differential expression of apoptosis-related genes from death receptor pathway in chronic myeloproliferative diseases. *J Clin Pathol.* 2011 Jan;64(1):75-82.
- [5] Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science.* 2002; 296: 1635-1636.
- [6] Čapláková V. Sledovanie molekulových zmien u vybraných nádorových ochorení. Dizertačná práca. 2017, str. 19.
- [7] Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4(2): 139-63.
- [8] Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. *N Engl J Med.* Cell death. 2009; 361(16): 1570-83.
- [9] Konopleva M, Zhao S, Hu W, Jiang S, Snell V, Weidner D, Jackson CE, Zhang X, Champlin R, Estey E, Reed JC, Andreeff M. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br J Haematol.* 2002 Aug;118(2):521-34.
- [10] Cowling V, Downward J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ.* 2002 Oct;9(10):1046-56.
- [11] Grütter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 2000; 10(6): 649-55.
- [12] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 2009 Aug;9(8):550-62.
- [13] Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene.* 2008 Sep 18;27(41):5443-53.
- [14] Fulda S. Shifting the balance of mitochondrial apoptosis: therapeutic perspectives. *Front Oncol.* 2012 Oct 8;2:121.
- [15] Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* 2006 May 25;441(7092):424-30.
- [16] Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasca SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL, Henson PM. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem.* 2004 May 14;279(20):21085-95.
- [17] Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem.* 1999 Jan 22;274(4):2225-33.
- [18] Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, and Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 2005 19: 1294–1305.
- [19] Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell.* 2005 Feb 4;17(3):393-403.
- [20] Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol.* 2001 Jun 11;153(6):1265-76.
- [21] Hatok J. Významné signálne dráhy a molekuly pri apoptóze. Elektronický zdroj, BCI Skriptá a učebné texty, Martin : JLF UK - Portál MEFANET , 2016.

Kaušitz J, Altaner Č. a kolektív autorov. 2003 Onkológia. Prvé vydanie. Vydala VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied v Bratislave. 239-267 s. ISBN: 80-224-0711-9.

NEINVAZÍVNE *IN-VIVO* MAPOVANIE MR-PARAMETROV PRI DIAGNOSTIKE INTRAKRANIÁLNYCH NÁDOROV

**P. Hnilicová¹, R. Richterová², E. Kantorová³, Š. Sivák³, E. Kurča³, K. Zelenák⁴,
B. Kolarovszki² a D. Dobrota⁵**

¹Biomedicínske centrum Martin, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine);

²Neurochirurgická, ³Neurologická a ⁴Rádiologická klinika, JLF UK v Martine a Univerzitná Nemocnica Martin;

⁵Ústav lekárskej biochémie, JLF UK v Martine

Korešpondujúca osoba:

Ing. Petra Hnilicová, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Biomedicínske centrum Martin – Divízia Neurovedy

Malá Hora 11161/4D, 036 01 Martin

e-mail: petra.hnilicova@jfmed.uniba.sk

Abstrakt

Napriek tomu, že je magnetická rezonancia (MR) dobre známym neinvazívnym lekárskeým nástrojom, jej modalita a technológie sa ešte stále rutinne nevyužívajú v klinickej onkologickej praxi. Komplexný multimodálny súbor špecifických, počítačovo kvantifikovaných MR parametrov mozgového tkaniva u pacientov s podozrením na intrakraniálny nádor by mohol poskytnúť presnejšie informácie o samotnom nádorovom tkanive. V tomto ohľade sú najviac užitočné protónová a fosforová magnetická rezonančná spektroskopia (¹H a ³¹P MRS), relaxometria relaxačného času T₂, difúzne-vážená magnetická rezonancia (DWI) a dynamicky-kontrastne vážená magnetická rezonancia (DCE MRI). Viacjadrová MRS je novodobá medicínska technika umožňujúca neinvazívnu, *in vivo* analýzu biochemických procesov prebiehajúcich v normálnom a patologicky zmenenom tkanive. Relaxometria je založená na vyhodnocovaní relaxačného času T₂, parametra odzrkadľujúceho mikroštruktúrne vlastnosti tkaniva. Zatiaľ čo DCE MRI umožňuje sledovať tkanivovú mikrovaskularitu, ako aj stav hematoencefalickej bariéry, DWI vytvára traktografické mapy tkaniva mozgu a zabezpečuje monitorovanie jeho nervových dráh. Všetky uvedené sofistikované meracie metodiky spolu s vyhodnocovacími postupmi a ich vzájomnou multiparametrickou analýzou môžu byť kľúčovými nástrojmi pri diagnostike intrakraniálnych nádorov.

Kľúčové slová: intrakraniálne nádory, ¹H a ³¹P MRS, relaxometria, DWI, DCE MRI

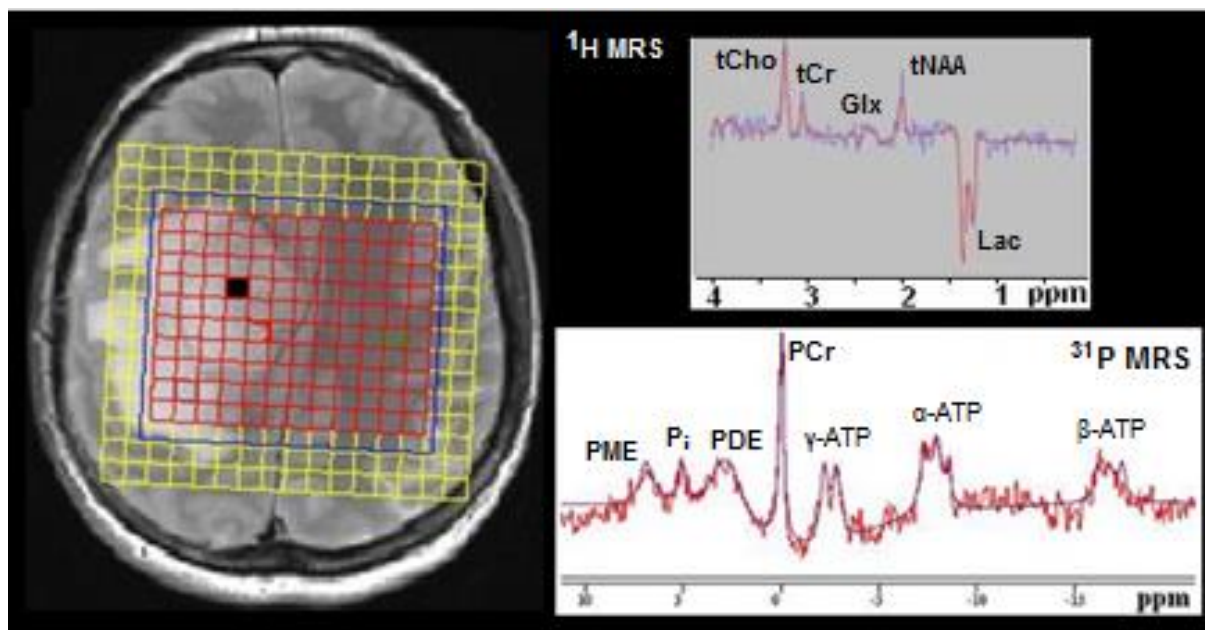
Úvod

Zlatým štandardom v diagnostike intrakraniálnych nádorov je použitie magnetického rezonančného zobrazovania (MRI), ktoré môže pomôcť odhaliť prítomnosť nádoru, hoci toto určenie môže byť subjektívne a nie vždy presné [1,2]. Existujú však viaceré MR modality, ktoré za účelom kvantifikácie MR dát využívajú počítačovo spracovávané matematické algoritmy pre získanie presných hodnôt špecifických parametrov charakteristických pre zdravé, ale aj nádorom ovplyvnené mozgové tkanivo. Presné počítačové hodnotenie týchto parametrov pomáha odhadnúť vlastnosti vyšetřovaného tkaniva, histologický typ či povahu nádoru, ale aj stupeň jeho malignity a tak zvyšujú citlivosť a špecifickosť MR vyšetřenia [3,4]. Navyše aplikácia novodobých MR metód vďaka svojej neinvazívnosti umožňuje *in vivo* monitorovanie intrakraniálnych nádorov, čím môže presnejšie slúžiť pri nastavení a hodnotení cielenej, personalizovanej terapie [5,6]. Vysoký informatívny prínos a individualizácia terapeutického prístupu by mohli mať aj ekonomické vplyvy na úsporu liečiv, farmák a iných zdravotníckych pomôcok.

Magnetická rezonančná spektroskopia

Protónová magnetická rezonančná spektroskopia (^1H MRS) zaznamenáva signál rezonujúcich ^1H jadier v chemických zlúčeninách, ktoré sa prezentujú vo forme metabolických pík (obr. 1) [2,7]. Týmto spôsobom sa neinvazívnou cestou získavajú *in vivo* informácie o viabilite a funkčnosti neurónov (N-acetylaspartát, N-acetyl-aspartyl-glutamát \approx tNAA) a gliových buniek (myoinozitol \approx mIns), o koncentráciách neurotransmiterov (glutamát \approx Glu, glutamín \approx Gln, kyselina γ -aminomaslová \approx GABA), o prebiehajúcich membránových procesoch (fosfatidylcholín, glycerofosfatidylcholín, acetylcholín a voľný cholín \approx tCho), o nekrotizácii tkaniva (laktát \approx Lac, lipidy \approx lip, makromolekuly \approx MM), ako aj o bunkovom energetickom metabolizme (kreatín a fosfokreatín \approx tCr) [1,7]. Zmenené koncentrácie niektorých metabolitov mozgu boli v rôznych štúdiách detegované pomocou ^1H MRS, pričom bola aj deklarovaná ich súvislosť s patologickými procesmi v mozgovom tkanive, a to dokonca skôr, než došlo k markantným prejavom ochorenia [3,5,6]. Napriech odbornou literatúrou sa dokonca uvádza, že pomocou ^1H MRS je možné jednoznačne rozlíšiť niektoré histologické typy a stupne malignity intrakraniálnych nádorov [2,3,4,6].

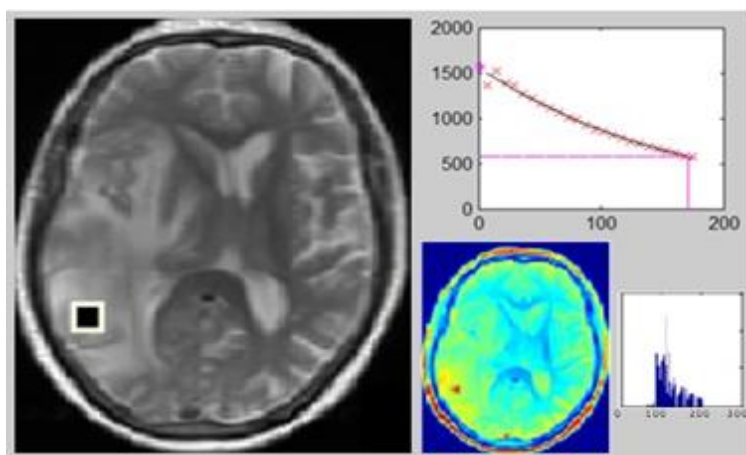
Fosforová magnetická rezonančná spektroskopia (^{31}P MRS) umožňuje vyhodnocovanie metabolických pík tých zlúčenín, ktorých funkčné skupiny obsahujú rezonujúce jadro fosforu ^{31}P [3,4]. Je tak možné vyšetřiť hladiny dôležitých mozgových metabolitov (obr. 1) vrátane energetických markerov (fosfokreatín \approx PCr, anorganický fosfát \approx Pi, adenosín trifosfáty \approx α - β - γ -ATP), metabolitov syntézy (fosfomonoestery \approx PME) a degradácie membránových fosfolipidov (fosfodiesterov \approx PDE) [8,9,10]. To, že ^{31}P MRS je vhodným onkologickým nástrojom, bolo prezentované už v mnohých štúdiách, ktoré dokazujú, že v nádorovom tkanive mozgu je možné pozorovať narastajúcu proliferáciu buniek (zvýšené hladiny PME, PDE), ako aj zvýšenú energetickú náročnosť tkaniva (nárast koncentrácií ATP a Pi, klesajúce hladiny PCr) a v neposlednom rade prítomnosť anaeróbneho metabolizmu (alkalické intracelulárne a acidické extracelulárne pH) [10,11].



Obr. 1 Neinvazívne vyšetrenie intrakraniálneho nádoru *in vivo* pomocou ^1H a ^{31}P MRS umožňuje analyzovať zmeny špecifických metabolitov tkaniva mozgu. Tieto spektrá boli zmerané na 1,5 Teslovom MR skeneri Siemens Magnetom a vyhodnotené pomocou softvérov LCModel (v.6.2-1L) v prípade ^1H MRS a jMRUI (v.5.0-219) v prípade ^{31}P MRS.

Relaxometria

Relaxometria je založená na mapovaní charakteristického relaxačného času T_2 , ktorý odráža pohyblivosť a chemické prostredie analyzovanej štruktúry tkaniva mozgu [12,13]. Táto neinvazívna metóda umožňuje *in vivo* vyšetrenie tkanivovej mikroštruktúry, intra- a extracelulárneho objemu vody [13,14], pričom pre jednotlivé MR rezy tkanivom vypočítava charakteristické parametrické mapy, či znázorňuje konkrétne hodnoty vo zvolenom vyšetrovanom bode (obr. 2) [13,15]. V odbornej literatúre sa často udávajú prináležiace rozmedzia hodnôt relaxometrických parametrov pre jednotlivé typy intrakraniálnych nádorov, dokonca v rozličných stupňoch malignity, jednoznačne ich odlišujúcich od zdravého mozgového tkaniva [14,15,16].

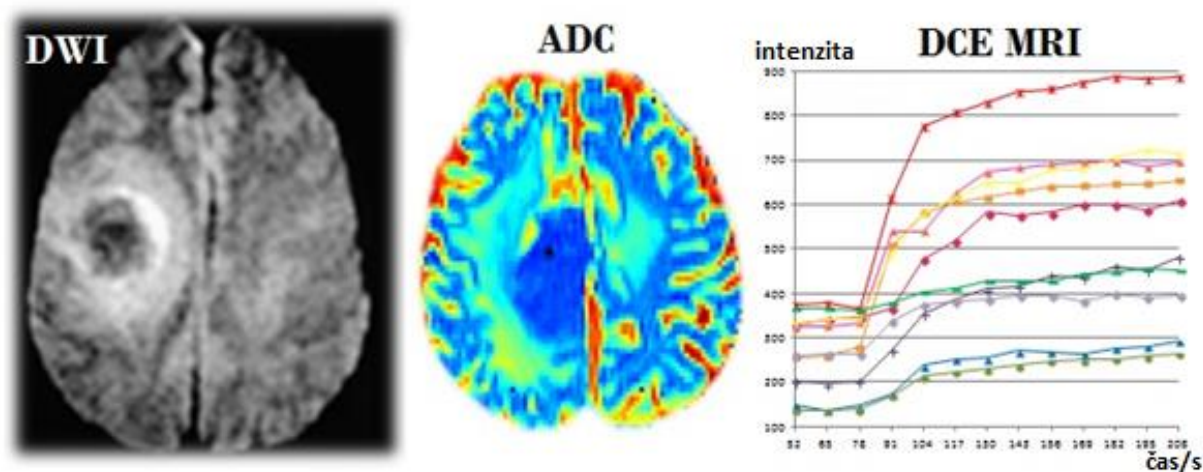


Obr. 2 Neinvazívne vyšetrenie intrakraniálneho nádoru *in vivo* pomocou relaxometrie (T_2 mapovanie) umožňuje analyzovať bunkovú hustotu a tkanivovú mikroštruktúru. Tieto MR-dáta boli zmerané na 1,5 Teslovom MR skeneri Siemens Magnetom a vyhodnotené pomocou programového prostredia Matlab.

Vážená magnetická rezonancia

Difúzne-vážené MRI (DWI) predstavuje techniku vyhodnocovania citlivých zmien intenzity signálu v tkanive spôsobených difúznym pohybom molekúl vody v mikroštruktúrach mozgu. Bolo dokázané, že na základe DWI je možné identifikovať intrakraniálne nádory z dôvodu typicky zvýšenej celularity tkaniva a tým aj spomalenia pohybu molekúl vody [4,17]. Pri DWI meraní vykonávanom vo viacerých smeroch naprieč vyšetrovaným tkanivom sa získavajú špecifické parametre odzrkadľujúce veľkosť a hustotou buniek (zjavný difúzny koeficient \approx ADC), ale aj priestorovú organizáciu tkaniva (frakčná anizotropia \approx FA), ktoré sú často prezentované v podobe vizualizácie dráh axónov v mozgovom tkanive (traktografia/difúzne tenzorové zobrazenie \approx DTI) [2,13,17]. Ukázalo sa, že hodnoty ADC a FA prispievajú k identifikácii nádorového procesu, rovnako ako DTI umožňuje určiť polohu nádoru (obr. 3) [18,19].

Dynamicky-kontrastne vážené MRI (DCE MRI) je séria trojdimenzionálnych T_1 vážených MR snímok meraných pred a po intravenóznom podaní kontrastnej látky na báze gadolína, ktorého paramagnetické vlastnosti spôsobujú skrátenie relaxačného času T_1 [6,20]. Na základe tohto fyzikálneho prejavu je možné pomocou DCE MRI diferencovať štruktúry, v ktorých dochádza k akumulácii kontrastnej látky z dôvodu zvýšenej vaskulatúry tkaniva, či narušenej hematoencefalickej bariéry [4,20,21]. Namerané kontrastne dynamické údaje sa zaznamenávajú vo forme kinetických kriviek (obr.3) pričom je možné získať fyzikálne parametre popisujúce tkanivovú angiogenézu [22,23]. DCE MRI tak prináša poznatky o tkanivových farmakokinetických a fyziologických vlastnostiach ako je perfúzia, stav hematoencefalickej bariéry, mikrovaskulatúra alebo priepustnosť ciev [23,24].



Obr. 3 Neinvazívne vyšetrenie intrakraniálneho nádoru *in vivo* pomocou DWI a DCE MRI umožňuje analyzovať stav hematoencefalickej bariéry a mikrovaskularitu tkaniva. Tieto MR-dáta boli zmerané na 1,5 Teslovom MR skeneri Siemens Magnetom a vyhodnotené pomocou programového prostredia Matlab.

Záver

Rozličné modality MR sú celosvetovo uznávané neinvazívne klinické metódy ktoré sa postupne integrujú do lekárskej praxe a to predovšetkým v neurológii, neurochirurgii, ale aj onkológii. Poskytujú jedinečnú anatomickú, morfológickú a biochemickú analýzu zdravého, ale aj nádorového tkaniva čím

napomáhajú k presnejšej lokalizácii, podrobnejšej diagnostike, ale aj monitorovaniu inktrakraniálnych nádorov.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Soares, D.P. and M. Law. Magnetic resonance spectroscopy of the brain: review of metabolites and clinical applications. *Clinical Radiology*. 2009, vol. 64, no. 1, pp. 12-21.
- [2] Belkic K., *Molecular Imaging through Magnetic Resonance for Clinical Oncology*. Cambridge: Cambridge International Science Publishing, 2004. ISBN 1-904602-29-0.
- [3] McKnight, T.R. and A. D. Wladman. Magnetic resonance spectroscopy in adult neoplasia. In: J. H. Gillard, A. D. Waldman and P. B. Barker. *Clinical MR Neuroimaging*: Cambridge: Cambridge University Press, 2010, pp. 295-312. ISBN 978-0-521-51563-4.
- [4] Pinker K. Molecular imaging of cancer: MR spectroscopy and beyond. In: *European Journal of Radiology*, 2012, vol. 81, no. 3, pp. 566-577.
- [5] Lukas, L. et al. Brain tumor classification based on long echo proton MRS signals. In: *Artificial Intelligence in Medicine*. 2004, vol. 31, no. 1, pp. 73-89.
- [6] Law M., *Perfusion And MRS For Brain Tumor Diagnosis*. In: R. Edelman et al., *Clinical Magnetic Resonance Imaging*. 3rd. Philadelphia: Saunders, 2006, pp. 3649. ISBN 0721603068.
- [7] De Graaf R.A., *In vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*. 2nd USA: A John Wiley & Sons, Inc., 2007. ISBN 978-0-470-02670-0.
- [8] WU R.H., et al. Preliminary Study of Mapping Brain ATP and Brain pH Using Multivoxel 31P MR Spectroscopy. In: *ICBME*. 2008, vol. 23, pp. 362-365.
- [9] Solivera J. et al. Assessment of 31P-NMR analysis of phospholipid profiles for potential differential diagnosis of human cerebral tumors. In: *NMR Biomed*. 2009, vol. 22(6), pp. 663-674.
- [10] Maintz D. et al. Phosphorus-31 MR spectroscopy of normal adult human brain and brain tumours. In: *NMR Biomed*. 2002, vol. 15, no. 1, pp. 18-27.
- [11] HA D.H., et al. Application of 31P MR Spectroscopy to the Brain Tumors. In: *Korean J Radiol*. 2013, vol. 14, no. 3, pp. 477-486.
- [12] Fanea L., *Relaxation Times Mapping Using Magnetic Resonance Imaging*. *Rom Rep Phys*, 2011 vol. 63, no. 2, pp.456–464.
- [13] Mikkelsen T. and D. Hearshen. Adult neoplasia: overview. In: J. H. Gillard, A.D. Waldman a P. B. Barker. *Clinical MR Neuroimaging: Physiological and Functional Techniques*. Cambridge: Cambridge University Press, 2010, pp. 289-294. ISBN 978-0-521-51563-4.
- [14] Chang K.J., *Applications of quantitative T1, T2, and proton density to diagnosis*. *Appl Radiol*. 2005, vol. 34, no. 1, pp 34-42.
- [15] Oh J. Quantitative Apparent Diffusion Coefficients and T2 Relaxation Times inCharacterizing Contrast Enhancing Brain Tumors and Regions of Peritumoral Edema. *J Magn Reson Imaging*, 2005, vol. 21, no. 6, pp. 701–708.
- [16] Yamada S.T1 and T2 relaxation times on gadolinium – diethylenetriaminepentaacetic acidenhanced MRI of brain tumors. *Tohoku J Exp Med*, 1990.vol.160(2), pp. 145–148.
- [17] Pamela W. Diffusion-weighted MRI of the Brain. In: *Radiology*. 2000, vol. 217, pp. 331–345.
- [18] Lee S.K. Diffusion Tensor and Perfusion Imaging of Brain Tumors in High-Field MR Imaging, In: *Neuroimag Clin N AM* 2012 vol. 22 no. 2, pp. 129-134.
- [19] Housni A. and S. Boujraf. Multimodal magnetic resonance imaging in the diagnosis and therapeutical follow-up of brain tumors. In: *Neurosciences*. 2013, vol. 18, no. 1, pp. 1-10.
- [20] Hylton, N. Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging As an Imaging Biomarker. In *J Clin Oncol*. 2006, vol. 24, pp. 3293-3298.
- [21] Castellani U., et al. DCE-MRI Data Analysis for Cancer Area Classification. In *Methods Inf Med* 2009, vol. 3 pp. 248-253.
- [22] Jackson A., et al. Imaging tumor vascular heterogeneity and angiogenesis using dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging. *Clin. Cancer Res.*, 2007, no. 13, pp. 3449-3459.
- [23] O'Connor J.P.B., et al. DCE-MRI biomarkers in the clinical evaluation of antiangiogenic and vascular disrupting agents. In *British Journal of Cancer* 2007 vol. 96, pp.189–195.
- [24] Türkbey B., et al. The role of dynamic contrast-enhanced MRI in cancer diagnosis and Treatment. In *Diagn Interv Radiol* 2010; vol.16, pp.186–192.

NOVÉ STRATEGICKÉ PRÍSTUPY V LIEČBE GLIOBLASTÓMU

Z. Majerčíková¹, B. Kolarovszki², P. Račay³ a J. Hatok¹

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)

²Neurochirurgická klinika, JLF UK v Martine a Univerzitná nemocnica Martin

³Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine

Korešpondujúca osoba:

Mgr. Zuzana Majerčíková
Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
Ústav lekárskej biochémie
Malá Hora 4D - 036 01 Martin – SK
E-mail: majercikov26@uniba.sk

Abstrakt

Multiformný glioblastóm (GBM) je najagresívnejší malígný nádor mozgu s veľmi zlou prognózou a limitovanou odpoveďou na dostupnú terapiu. Doba prežívania pacientov je krátka, len 5% pacientov prežije viac ako 3 roky od diagnostikovania ochorenia. Nádor sa vyznačuje vysokou heterogenitou, jeho patogenéza zahŕňa početné mutácie v niektorých kritických signálnych dráhach zúčastňujúcich sa v procese angiogenézy, delení a prežití bunky. Preto pochopenie molekulárnych mechanizmov, ktoré sú základom agresívneho správania tumoru, môže viesť k lepšiemu manažmentu, vhodným terapiám a z toho vyplývajúcim úspešným výsledkom. V tomto článku sa zaoberáme vybraným signálnym molekulám a ich inhibítormi so súčasným využitím v personalizovanej liečbe.

Kľúčové slová: glioblastómy, cielená terapia, signálne dráhy

Úvod

Multiformný glioblastóm (GBM) je najrozšírenejšou formou primárneho mozgového nádoru a jedna z najsmrteľnejších a najnáročnejších ľudských malignít [1]. Tento najbežnejší gliálny nádor je asociovaný so zlou prognózou, priemerná doba prežívania pacientov s GBM je 12 – 15 mesiacov od diagnostikovania tumoru [2]. GBM sú klasifikované ako primárne a sekundárne podtypy na základe klinického prejavu a vlastností, hoci na histologickej úrovni sú nerozoznateľné [1]. V 95% diagnostikovaných prípadoch ide o primárny GBM vznikajúci *de novo* [3]. Primárne GBM postihujú prevažne starších ľudí (priemerný vek 64 rokov) [1]. Sekundárne GBM vznikajú z astrocytómov s nízkym stupňom malignity a vyskytujú sa prevažne u pacientov mladších ako 45 rokov. Štandardná liečba je paliatívna, pozostáva z kombinácie chirurgického zákroku, rádioterapie a chemoterapie Temozolomidom [4]. Napriek agresívnej terapii rýchlo dochádza ku smrti pacienta [5]. Preto je hľadanie nových molekulárnych cieľov a výskum terapeutík kritický. Vďaka programu The Cancer Genome Atlas (TCGA) boli identifikované genetické mutácie vyskytujúce sa vo väčšej či menšej miere u glioblastómových nádorových buniek a to vo viacerých dráhach, pričom ku najvýznamnejším radíme signalizáciu sprostredkovanú tyrozínkinázovými receptormi (RTK) a reguláciu bunkového cyklu proteínmi p53 a retinoblastomovým proteínom (pRB) [6]. Komponentom spomenutých dráh je momentálne venované veľké úsilie pri navrhovaní cielených terapií.

Tyrozínkinázové receptory

Tyrozínkinázové receptory (RTK) sú na povrch viazané receptory pre rastové faktory, hormóny, cytokíny a iné extracelulárne signálne molekuly. Po interakcii s ligandom aktivujú svojou kinázovou aktivitou dve hlavné downstream signálne dráhy Ras/MAPK/ERK a Ras/PI3K/AKT, ktoré regulujú bunkovú proliferáciu, diferenciáciu, angiogénzu a prežívanie buniek [7]. Z tohto dôvodu patria medzi sľubné ciele pre protinádorovú terapiu [5]. Do rodiny tyrozínkinázových receptorov patrí napr. receptor pre epidermálny rastový faktor (EGFR), receptor pre vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGFR), receptor pre rastový faktor odvodený od trombocytov (PDGFR), receptor pre hepatocytický rastový faktor (c-MET/HGFR), receptor pre fibroblastový rastový faktor (FGFR) alebo receptor pre inzulínu podobný rastový faktor 1 (IGF-1R).

Molekuly inhibujúce kinázovú aktivitu receptora

Mnoho látok v kontexte liečby multiformného glioblastómu cieľi práve na kinázovú aktivitu RTK. Radíme medzi ne **Erlotinib**, ktorý inhibuje tyrozínkinázový receptor EGFR tým, že sa viaže na monomér receptora a zabraňuje autofosforylácii [8]. Táto látka bola testovaná vo viacerých klinických štúdiách fázy II zameraných na monoterapiu Erlotinibom u pacientov s GBM a v kombinácii s Temozolomidom u pacientov s práve diagnostikovaným GBM [8, 9]. Dvojkombinácia liečiv bola pacientmi pomerne dobre tolerovaná, terapia dokonca viedla k vyššej miere prežívania [8]. Monoterapia u pacientov s rekurentným GBM sa ale ukázala ako neúčinná [9]. **Gefitinib** (ZD1839/Iressa), taktiež inhibítor EGFR, zvýšil mieru rádiosenzitivity u nádorových buniek U251 *in vitro* [10]. Počas druhej fázy klinických testov sa však nepreukázalo celkové zlepšenie stavu pacientov s práve diagnostikovaným GBM oproti doteraz známej liečbe [11].

AEE788 a **Vandetanib** sú inhibítormi tyrozínkináz EGFR a VEGFR. Ďalšie štúdie na AEE788 boli ukončené z dôvodu vysokej toxicity a minimálneho príspevku v liečbe rekurentného multiformného glioblastómu [12]. Naopak Vandetanib v kombinácii s inhibítormi histónových deacetyláz (HDACI) inhiboval proliferáciu GBM buniek *in vitro* [13]. Štúdie fázy II klinických výskumov nepreukázali pozitívny efekt v liečbe GBM, preto bol ďalší výskum taktiež ukončený [14, 15]. Vatalanib a Cediranib sú inhibítormi VEGFR. **Vatalanib** (PTK787) ako inhibítor VEGFR bol veľmi dobre tolerovaný, no mal minimálny účinok na regresiu nádoru [16]. Vo fáze III klinických testov sa nepreukázal pozitívny vplyv **Cediranibu** (AZD2171) ako monoterapie ani v kombinácii s Lomustínom na inhibíciu rastu nádorov u pacientov [17]. Predklinické testy však naznačili súvislosť medzi použitím Cediranibu s rádioterapiou a normalizáciou nádorových ciev. Na základe týchto zistení je skúmanie synergie chemorádioterapie a Cediranibu už v druhej fáze klinických testov [18].

Sunitinib, inhibítor viacerých tyrozínkináz (PDGFR- α/β , VEGFR 1-3, KIT, RET, FLT3 a CSF1R), nebol v klinických testoch ako monoterapia účinný, u pacientov nastala progresia ochorenia napriek terapii [19, 20]. Tyrozínkinázové receptory PDGFR- α/β , Bcr-Abl, c-FMS a c-KIT môžu byť atakované použitím inhibítora **Imatinib** (Gleevec/ST1571), ktorý v klinických testoch fázy II v menšej miere preukázal prospešný účinok u pacientov s GBM [21]. Zato ošetrovanie glioblastómových buniek **Tyrphostínom** (AG-1296), taktiež inhibítorom viacerých tyrozínkináz, *in vitro* znížilo ich životaschopnosť [22]. V predklinických *in vivo* testoch sa na xenograftickom myšacom modeli protinádorový účinok len potvrdil. **Lenvatinib** (E7080) a **Nintedanib** sú inhibítormi VEGFR, FGFR a PDGFR. Oba lieky boli testované v druhej fáze klinických aplikácií [23, 24]. Len Lenvatinib mal mierne pozitívny účinok pre pacientov s GBM, terapia však bola spojená s vysokou toxicitou Lenvatinibu. **PD173074**, ďalší multiinhibítor tyrozínkináz FGFR a VEGFR mal v *in vitro* testoch tumorostatický efekt, čo sa však musí potvrdiť v ďalších klinických testoch [25].

Foretinib a **SGX-523** sú molekuly inhibujúce tyrozínkinázu HGFR/ c-MET *in vitro* a protinádorový účinok vykazovali aj v *in vivo* testoch na xenograftickom myšacom modeli [26, 27].

PQ401, **GSK1838705A**, **PPP** (Pikropodofilín/AXL1717) a **NVP-AEW541** sú inhibítormi tyrozínkinázy IGF-1R, ktorých inhibičný účinok bol potvrdený v predklinických testoch *in vitro*, v prípade terapie pomocou GSK1838705A a PPP aj *in vivo* na zvieracích modeloch [28, 29, 30, 31]. PPP v prvej fáze klinických testov vykazoval tumorostatický účinok u 44% pacientov [32]. **BMS-536924** je ATP kompetitívny inhibítor IGF-1R/IR, ktorý má v *in vitro* podmienkach protinádorový účinok na bunky rezistentné voči Temozolomidu [32].

Tieto molekuly boli študované ako potenciálne liečivá u rôznych typov nádorov (tab. 1), vykazovali odlišnú účinnosť a iba málo molekúl bolo vhodných na ďalšie testovanie [5].

Monoklonálne protilátky voči RTK extracelulárnej doméne

Okrem kinázovej domény je ďalším z možných cieľov extracelulárna doména priamo interagujúca s ligandom [5]. Molekuly brániace väzbe ligandu na receptor nádorovej bunky zabraňujú kontinuálnej aktivácii kinázovej aktivity receptora [33]. Monoklonálna protilátka **Cetuximab** interaguje s EGFR, zabraňuje spusteniu signálnej dráhy a limituje zhubnosť nádoru [34]. Cetuximab bol testovaný ako záchranná terapia v prípadoch, kedy zlyhal chirurgický zákrok, rádioterapia aj chemoterapia. Terapiu

pacienti znášali dobre, avšak aktivita protilátky bola v klinických testoch fázy II minimálna. **Onartuzumab** je schopný inhibovať činnosť HGFR/c-MET. V *in vivo* myšacom modeli lokálna liečba spôsobila takmer úplnú inhibíciu rastu glioblastómu [35]. Mechanizmus inhibície zahŕňa antiproliferačné, antiangiogénne a proapoptotické účinky. V klinických testoch fázy II sa však nepreukázal klinický prínos Onartuzumabu na terapiu Bevacizumabom [37]. Pri terapií protilátkami je kritická ich veľkosť [36]. Len malé percento z pôvodnej dávky je schopné prekonať hematoencefalickú bariéru a dostať sa priamo na želané miesto účinku [5]. Riešením môžu byť bišpecifické protilátky interagujúce s transportným systémom a následne s nádorom. Protilátky viažuce sa na transferínový receptor boli už úspešne testované na myšiach a primátoch [37].

Molekuly cielené proti ligandom RTK

Niektoré protilátky fungujú aj ako vychytávače ligandov, čím zabraňujú aktivácii receptorov (Tab.1). **Aflibercept** vychytáva VEGF (ligand pre VEGFR). U pacientov s GBM však ako monoterapia vykazoval minimálnu inhibičnú aktivitu [38]. Predklinické štúdie však naznačili možnú synergickú aktivitu rádioterapie a terapie Afliberceptom [39]. **Rilotumumab** vyvážuje ligand HGF a bráni interakciám s receptorom HGFR/c-MET. Dvojkombinácia temozolomid-Rilotumumab výrazne inhibovala rast glioblastómových buniek U87MG *in vitro* [40]. Počas klinických testov však u pacientov ako monoterapia nemal skoro žiadny účinok [41]. Hoci je vychytávanie ligandov a znemožnenie aktivity receptorov jednou z ciest boja proti GBM, tento spôsob nie je najvhodnejší [5]. V dôsledku mutácií sa receptory môžu stať kontinuálne aktívnymi, bez potreby ligandom sprostredkovanej aktivácie. V tom prípade je terapia neúčinná.

Komponenty signálnych dráh sprostredkovaných tyrozínkinázovými receptormi

Fosfatidylinozitol-3-kináza

Fosfatidylinozitol-3-kináza (PI3K) je enzým zúčastňujúci sa regulácie bunkového cyklu, proliferácie a apoptózy [5]. Veľké percento glioblastómových buniek má mutáciu práve v géne pre PI3K. Látky inhibujúce PI3K dokázali svoju aktivitu *in vitro* na bunkách a *in vivo* na myšacích modeloch, no ich prínos v terapií pacientov s GBM musí byť testovaný a dokázaný v klinických štúdiách. **PX-866** (Sonolisib) je ireverzibilný inhibítor PI3K, ktorý inhiboval angiogézu a invazívnosť GBM buniek, dokonca zapríčinil zastavenie bunkového cyklu v podmienkach *in vitro* [42]. V klinickom teste fázy II sa ale nezabránilo progresii ochorenia až u 73% pacientov [43].

mTOR

V klinických testoch bol na GBM testovaný účinok viacerých mTor inhibítorov a to s rôznymi výsledkami. Napríklad **Temsirolimus** v klinickej fáze II nemal žiadny vplyv na GBM [44]. Zato **AZD2014** (Vistusertib) zvýšil citlivosť glioblastómových kmeňových buniek na rádioterapiu *in vitro* aj *in vivo* [45].

Ras proteín atakovaný aminobisfosfonátmi

Ďalším z možných cieľov pre terapiu GBM je Ras proteín. Ako efektor viacerých signálnych dráh sa podieľa na stimulácii proliferácie a diferenciácie. Onkogénne bodové mutácie v troch ľudských Ras génoch boli detegované vo veľkej škále nádorových ochorení, v GBM len minimálne [6, 46]. Väčšina

glioblastómov však vykazuje zvýšené hladiny Ras-GTP, aktívnej formy Ras proteínu, čo zabezpečuje jeho aberantnú aktivitu [47]. Aminobisfosfonáty sú látky so sľubným protinádorovým účinkom tým, že inhibujú farnezyláciu Ras proteínu, a tak zabráňujú jeho downstream Ras-GTPázovej aktivite [48].

Kyselina zoledrónová (ZOC) je aminobisfosfonát s protinádorovým účinkom používaný na liečbu metastáz v kostiach [49].

Na liečenie mozgových nádorov je však potrebné prekonanie hematoencefalickej bariéry. Problém doručenia látky priamo do nádoru bez chirurgického zákroku riešia nanočastice Tf-PLCaPZ [50]. Sú ligované s transferínom a dokážu tak interagovať s receptorom pre transferín. ZOC zbalená do Tf-PLCaPZ je prenesená cez hematoencefalickú bariéru transferínom sprostredkovaným transportom. V predklinických testoch sa dokázal dôležitý účinok Tf-PLCaPZ *in vitro* aj *in vivo* [50, 51]. Tieto vynikajúce výsledky musia byť potvrdené v klinických testoch, no sú nádejnou terapiou GBM (tab. 1).

Proteínkináza C

Proteínkináza C (PKC) je enzým podieľajúci sa na rôznych mechanizmoch bunkovej odpovede: regulácií génovej expresie, sekrécií proteínov, zápalovej odpovedi aj na bunkovej proliferácii.

Enzastaurín, inhibítor PKC β v klinických testoch fázy I a II v porovnaní s alkylačným chemoterapeutikom Lomustínom (fáza III, rekurentný GBM) nevykazoval lepšie výsledky [52].

Tumor supresory p53 a pRB

P53 a pRB signálne dráhy sú ovplyvnené vo veľkom množstve nádorov vrátane GBM. Až 87% GBM má ovplyvnenú p53 dráhu s mutáciami alebo deléciami priamo v géne pre p53 v 28-35% a 78% pRB dráhu s deléciami alebo mutáciami v géne pre pRB v 7,6-11% [6]. Kvôli dôležitosti týchto proteínov v patogenéze GBM bolo nutné nájsť spôsob ako obnoviť prítomnosť neporušeného a aktívneho proteínu v GBM. **SGT-53** je nanokomplex, ktorý do glioblastómových nádorových buniek doručí wild-type p53 [53]. Tento postup bol úspešne aplikovaný na GBM bunky rezistentné voči temozolomidu *in vivo* aj *in vitro*. Ako alternatíva transportu sa môže využiť doručenie wild-type p53 do nádorových buniek pomocou vírusov. V klinickej fáze I sa testuje **Ad-p53**, ide o adenovírus, ktorý do nádorových buniek doručí p53, čím spôsobí apoptózu transfekovaných nádorových buniek [54]. **PD0332991** (Palbociclib) je inhibítor Cdk4/6 a tak inhibuje downstream inhibíciu pRB. V predklinických testoch Palbociclib inhiboval rast myšacieho nádoru v *in vivo* podmienkach [55].

O⁶-metylguanín-DNA metyltransferáza

O⁶-metylguanín-DNA metyltransferáza (MGMT) je zodpovedná za rezistenciu nádorových buniek na Temozolomid (metyluje DNA). MGMT odštiepi metyl naviazaný na guaníne, viaže ho na cysteín vo svojom aktívnom mieste, a tak sa nevratne inaktivuje [56]. O⁶-benzylguanín je látka, ktorá blokuje aktívne miesto enzýmu práve interakciou s cysteínom a tak ho inaktivuje [57]. Na predklinických myšacích modeloch **O⁶-benzylguanín** zosilnil účinok Temozolomidu a Carmustínu, s ktorými bol podávaný, no tento efekt sa nepotvrdil na pacientoch s GBM rezistentným voči Temozolomidu [57, 58].

Tabuľka 1: Príklady inhibítorov tyrozínkinázových receptorov testovaných na GBM

Tyrozínkinázový receptor	Molekulárny cieľ	Inhibítor	Klinické testy	Výsledky klinických testov
EGFR	EGFR	Erlotinib (Tarceva)	Fáza II, novo diagnostikovaný a rekurentný GBM	monoterapia bez účinku dvojkombinácia s Temozolomidom vyššia miera prežívania pacientov bez účinku v porovnaní s používanou liečbou
		Gefitinib (ZD1839/Iressa)	Fáza II, novo diagnostikovaný GBM	bez účinku, vysoká toxicita
		AEE788 (Everolimus)	Fáza I, rekurentný GBM	bez účinku, vysoká toxicita
		Vandetanib (ZD6474)	Fáza II, novo diagnostikovaný GBM Fáza I/II, rekurentný GBM	minimálny účinok
	extracelulárna doména EGFR	Cetuximab (Erbix)	Fáza I/II, novo diagnostikovaný a rekurentný GBM	NCT02861898, NCT02800486, NCT01884740
VEGFR	VEGFR	Vatalanib (PTK787)	Fáza I, novo diagnostikovaný GBM	minimálny účinok
	VEGFR-2	Cediranib (AZD2171)	Fáza III, rekurentný GBM v kombinácii s Lomustínom	bez účinku
	VEGFR, PDGFR, FLT1, FLT1/KDR, FLT3 a RET kinázy	Sunitinib	Fáza II, novo diagnostikovaný a rekurentný GBM	NCT02928575
	PGFR, FGFR a VEGFR	Nintedanib (BIBF11220)	Fáza II, rekurentný GBM	bez účinku
	VEGF	Aflibercept	Fáza II, rekurentný GBM	minimálny účinok
PDGFR	PDGFR α , PDGFR β , Bcr-Abl, c-FMS a c-KIT	Imatinib mesylát (Gleevec/ST1571)	Fáza I/II, rekurentný GBM	pozitívny účinok
	PDGFR α , PDGFR β , c-KIT, BEK, FMS podobná tyrozínkináza 3	Tyrphostín	-	-
	VEGFR, FGFR a PDGFR	Lenvatinib (E7080)	Fáza II, rekurentný GBM	minimálny účinok, toxicita
HGFR/c-MET	c-MET a VEGFR-2	Foretinib	-	-
	c-MET	SGX-523	-	-
	HGF	Rilotumumab (AMG102)	Fáza II, rekurentný GBM	monoterapia bez účinku
	extracelulárna doména c-MET	Onartuzumab	Fáza II, rekurentný GBM	bez účinku
FGFR	FGFR, VEGFR	PD173074	-	-
IGF-1R	IGF-1R	PQ401	-	-
		GSK1838705A	-	-
		PPP (AXL1717)	Fáza I, rekurentný GBM	tumorostatický účinok
		NVP-AEE541	-	-
	IGF-1R/IR	BMS-536924	-	-

Záver

Multiformný glioblastóm je ochorenie náročné a veľmi zle odpovedajúce na súčasnú liečbu, z čoho vyplýva nepriaznivá prognóza pre pacientov trpiacich touto diagnózou. Genomické analýzy odhalili dysreguláciu veľkého počtu kľúčových signálnych dráh, na ktoré môžu cieľiť nové terapeutiká. Na ich výskume je ale potrebné neustále pracovať. Účinnosť inhibície jednotlivých komponentov pomocou malých molekúl alebo protilátok je rôzna. Solídne tumory sú charakterizované vysokým stupňom heterogenity, preto je zasahovanie viacerých dysregulovaných dráh súčasne a na rôznych úrovniach žiaduce. Súbežné podávanie látok s rôznym účinkom môže výrazne zvýšiť účinnosť terapie. Táto stratégia je však náročná z farmakokinetického a farmakodynamického pohľadu. Ďalším problémom je prekonanie hematoencefalickej bariéry. Terapeutiká, ktoré vykazujú sľubné výsledky *in vitro* zlyhávajú v klinických testoch. Riešením môže byť transport menších molekúl pomocou nanočastíc, interakciou protilátok s ligandom pre membránový receptor alebo technikou cieleného ultrazvuku a mikrobublín [50, 59]. Tieto techniky by mohli zvýšiť koncentráciu terapeutík v prostredí nádoru a zvýšiť tak ich účinok. Imunoterapia je ďalšou z možností, mnohé vstupujú do klinických testov s dobrými predklinickými výsledkami [60]. S novými terapiami prichádza nádej pre liečbu GBM.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A a kol (2013) Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. Arch Immunol Ther Exp 61:25–41.
- [2] Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. N Eng J Med 359:492–507.
- [3] Ohgaki H, Dessen P, Jourde B a kol (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res 64:6892–6899.
- [4] Yang LJ, Zhou CF, Lin ZX (2014) Temozolomide and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review. Cancer Invest 32:31–36.
- [5] Pearson JRD, Regad T (2017) Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. Signal Transduct Target Ther 2:17040.
- [6] TCGA (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 455:1061–1068.
- [7] Regad T (2015) Targeting RTK signaling pathways in cancer. Cancers (Basel) 7:1758–1784.
- [8] Prados MD, Chang SM, Butowski N a kol (2009) Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. J Clin Oncol 27: 579–584.
- [9] Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB a kol (2010) A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. Neuro Oncol 12:95–103.
- [10] Stea B, Falsey R, Kislin K a kol (2003) Time and dosedependent radiosensitization of the glioblastoma multiforme U251 cells by the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa'). Cancer Lett 202:43–51.
- [11] Uhm JH, Ballman KV, Wu W a kol (2011) Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. Int J Radiat Oncol Biol Phys 80:347–353.
- [12] Reardon DA, Conrad CA, Cloughesy T a kol (2012) Phase I study of AEE788, a novel multitarget inhibitor of ErbB- and VEGFreceptor- family tyrosine kinases, in recurrent glioblastoma patients. Cancer Chemother Pharmacol 69:1507–1518.
- [13] Jane EP, Premkumar DR, Addo-Yobo SO, Pollack IF (2009) Abrogation of mitogenactivated protein kinase and Akt signaling by vandetanib synergistically potentiates histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis in human glioma cells. J Pharmacol Exp Ther 331:327–337.
- [14] Lee EQ, Kaley TJ, Duda DG, a kol (2015) A Multicenter, Phase II, randomized, noncomparative clinical trial of radiation and temozolomide with or without vandetanib in newly diagnosed glioblastoma patients. Clin Cancer Res 21:3610–3618.

- [15] Kreisl TN, McNeill KA, Sul J a kol (2012) A phase I/II trial of vandetanib for patients with recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol* 14:1519–1526.
- [16] Gerstner ER, Eichler AF, Plotkin SR a kol (2011) Phase I trial with biomarker studies of vatalanib (PTK787) in patients with newly diagnosed glioblastoma treated with enzyme inducing anti-epileptic drugs and standard radiation and temozolomide. *J Neurooncol* 103:325–332.
- [17] Batchelor TT, Mulholland P, Neyns B a kol (2013) Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 31:3212–3218.
- [18] Winkler F, Kozin SV, Tong RT a kol (2004) Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6:553–563.
- [19] Martinho O, Zucca LE, Reis LM (2015) AXL as a modulator of sunitinib response in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 332:1–10.
- [20] Neyns B, Sadones J, Chaskis C a kol (2011) Phase II study of sunitinib malate in patients with recurrent high-grade glioma. *J Neurooncol* 103:491–501.
- [21] Wen PY, Yung WK, Lamborn KR (2006) Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08. *Clin Cancer Res* 12:4899–4907.
- [22] Li H, Zheng J, Guan R a kol (2015) Tyrphostin AG 1296 induces glioblastoma cell apoptosis in vitro and in vivo. *Oncol Lett* 10:3429–3433.
- [23] Norden AD, Schiff D, Ahluwalia MS a kol (2015) Phase II trial of triple tyrosine kinase receptor inhibitor nintedanib in recurrent high-grade gliomas. *J Neurooncol* 121:297–302.
- [24] Reardon DA, Pan E, Fan J a kol (2012) 417PD A phase II trial of the multitargeted kinase inhibitor lenvatinib (E7080) in patients (pts) with recurrent glioblastoma (GBM) and disease progression following prior bevacizumab treatment. *Ann Oncol* 23:ix144–ix151.
- [25] Loilome W, Joshi AD, ap Rhys CM a kol (2009) Glioblastoma cell growth is suppressed by disruption of Fibroblast Growth Factor pathway signaling. *J Neurooncol* 94:359–366.
- [26] Knubel KH, Pernu BM, Sufit A a kol (2014) MerTK inhibition is a novel therapeutic approach for glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 5:1338–1351.
- [27] Guessous F, Zhang Y, di Pierro C a kol (2010) An orally bioavailable c-Met kinase inhibitor potently inhibits brain tumor malignancy and growth. *Anticancer Agents Med Chem* 10: 28–35.
- [28] Zhou X, Zhao X, Li X a kol (2016) PQ401, an IGF-1R inhibitor, induces apoptosis and inhibits growth, proliferation and migration of glioma cells. *J Chemother* 28: 44–49.
- [29] Zhou X, Shen F, Ma P a kol (2015) GSK1838705A, an IGF-1R inhibitor, inhibits glioma cell proliferation and suppresses tumor growth in vivo. *Mol Med Rep* 12:5641–5646.
- [30] Yin S, Girnita A, Stromberg T a kol (2010) Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor by picropodophyllin as a treatment option for glioblastoma. *Neuro Oncol* 12:19–27.
- [31] Premkumar DR, Jane EP, Pollack IF (2010) Co-administration of NVP-AEW541 and dasatinib induces mitochondrial-mediated apoptosis through Bax activation in malignant human glioma cell lines. *Int J Oncol* 37:633–643.
- [32] Aiken R, Axelson M, Harmenberg J a kol (2017) Phase I clinical trial of AXL1717 for treatment of relapsed malignant astrocytomas: analysis of dose and response. *Oncotarget* 8:81501–81510.
- [33] Zhou Q. (2015) BMS-536924, an ATP-competitive IGF-1R/IR inhibitor, decreases viability and migration of temozolomide-resistant glioma cells in vitro and suppresses tumor growth in vivo. *Onco Targets Ther* 8:689–697.
- [34] Belda-Iniesta C, Carpeno Jde C, Saenz EC a kol (2006) Long term responses with cetuximab therapy in glioblastoma multiforme. *Cancer Biol Ther* 5:912–914.
- [35] Neyns B, Sadones J, Joosens E a kol (2009) Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol* 20:1596–1603.
- [36] Martens T, Schmidt NO, Eckerich C a kol (2006) A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clin Cancer Res* 12:6144–6152.
- [37] Cloughesy T, Finocchiaro G, Belda-Iniesta C a kol (2017) Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Phase II Study of Onartuzumab Plus Bevacizumab Versus Placebo Plus Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: Efficacy, Safety, and Hepatocyte Growth Factor and O6-Methylguanine–DNA Methyltransferase Biomarker Analyses. *J Clin Oncol* 35:343–351.
- [38] Yu YJ, Watts RJ (2013) Developing therapeutic antibodies for neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics* 10:459–472.
- [39] Yu YJ, Atwal JK, Zhang Y a kol (2014) Therapeutic bispecific antibodies cross the blood-brain barrier in nonhuman primates. *Sci Transl Med* 6:261ra154.
- [40] de Groot JF, Lamborn KR, Chang SM a kol (2011) Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *J Clin Oncol* 29:2689–2695.
- [41] Wachsberger PR, Burd R, Cardi C a kol (2007) VEGF trap in combination with radiotherapy improves tumor control in u87 glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67:1526–1537.
- [42] Giordano S (2009) Rilotumumab, a mAb against human hepatocyte growth factor for the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther* 11:448–455.
- [43] Wen PY, Schiff D, Cloughesy TF a kol (2011) A phase II study evaluating the efficacy and safety of AMG 102 (rilotumumab) in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 13:437–446.
- [44] Koul D, Shen R, Kim YW a kol (2010) Cellular and in vivo activity of a novel PI3K inhibitor, PX-866, against human glioblastoma. *Neuro Oncol* 12:559–569.

- [45] Pitz MW, Eisenhauer EA, MacNeil MV a kol (2015) Phase II study of PX-866 in recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 17:1270–1274.
- [46] Chang SM, Wen P, Cloughesy T a kol (2005) Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs* 23:357–361.
- [47] Kahn J, Hayman TJ, Jamal M a kol (2014) The mTORC1/mTORC2 inhibitor AZD2014 enhances the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells. *Neuro Oncol* 16:29–37.
- [48] Knobbe ChB, Reifenberger J, Reifenberger G (2004) Mutation analysis of the Ras pathway genes NRAS, HRAS, KRAS and BRAF in glioblastomas. *Acta Neuropathol* 108:467–470.
- [49] Guha A, Feldkamp MM, Lau N a kol (1997) Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene* 15:2755–2765.
- [50] Caraglia M, Santini D, Marra M a kol (2006) Emerging anticancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocr Relat Cancer* 13:7–26.
- [51] Marra M, Salzano G, Leonetti C a kol (2011) Nanotechnologies to use bisphosphonates as potent anticancer agents: the effects of zoledronic acid encapsulated into liposomes. *Nanomedicine* 7:955–964.
- [52] Salzano G, Zappavigna S, Luce A a kol (2016) Transferrin-targeted nanoparticles containing zoledronic acid as a potential tool to inhibit glioblastoma growth. *J Biomed Nanotechnol* 12:811–830.
- [53] Porru M, Zappavigna S, Salzano G a kol (2014) Medical treatment of orthotopic glioblastoma with transferrin-conjugated nanoparticles encapsulating zoledronic acid. *Oncotarget* 5:10446–10459.
- [54] Wick W, Puduvalli VK, Chamberlain MC a kol (2010) Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J Clin Oncol* 28:1168–1174.
- [55] Kim SS, Rait A, Kim E (2015) A tumor-targeting p53 nanodelivery system limits chemoresistance to temozolomide prolonging survival in a mouse model of glioblastoma multiforme. *Nanomedicine* 11:301–311.
- [56] Lang FF, Bruner JM, Fuller GN a kol (2003) Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. *J Clin Oncol* 21:2508–2518.
- [57] Michaud K, Solomon DA, Oermann E a kol (2010) Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res* 70:3228–3238.
- [58] Gerson SL (2004) MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4:296–307.
- [59] Wedge SR, Newlands ES (1996) O6-benzylguanine enhances the sensitivity of a glioma xenograft with low O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity to temozolomide and BCNU. *Br J Cancer* 73:1049–1052.
- [60] Quinn JA, Pluda J, Dolan ME a kol (2002) Phase II trial of carmustine plus O(6)-benzylguanine for patients with nitrosourea-resistant recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 20:2277–2283.
- [61] Ting CY, Fan CH, Liu HL a kol (2012) Concurrent bloodbrain barrier opening and local drug delivery using drug-carrying microbubbles and focused ultrasound for brain glioma treatment. *Biomaterials* 33:704–712.
- [62] Schuster J, Lai RK, Recht LD a kol (2015) A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro Oncol* 17:854–861.

ÚLOHA VITAMÍNU C V PREVENCII A LIEČBE NÁDOROVÝCH OCHORENÍ

R. Murín, E. Gondáš a D. Dobrota

Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Martin, Slovenská republika

Korešpondujúca osoba:

Radovan Murín

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Ústav lekárskej biochémie

Malá Hora 4D

036 01 Martin

E-mail: murin@jfmed.uniba.sk

Abstrakt

Vitamín C patrí medzi esenciálne látky, ktoré získava ľudský organizmus len zo stravy. Okrem jeho úloh v metabolizme neurotransmitterov, syntézy kolagénu a antioxidantu sa v súčasnosti dostáva do pozornosti aj jeho schopnosť spolupodieľať sa na epigenetickej regulácii génovej expresie. Ako jeden z kofaktorov 2-oxoglutarát-závislých dioxygenáz, medzi ktoré patria aj TET enzýmy, sa vitamín C spolupodieľa na tvorbe 5-hydroxymetylcytozínu a tým reguluje metylačný stav DNA. Pre nádorové bunky je charakteristický pokles zastúpenia 5-hydroxymetylcytozínu v ich genóme, ktorý koreluje s poklesom enzymatickej aktivity TET enzýmov a vnútrobunkovej koncentrácie vitamínu C. Aplikácia vitamínu C a s ňou spojený nárast vnútrobunkovej koncentrácie vitamínu C iniciuje obnovenie aktivity TET enzýmov a tvorbu 5-hydroxymetylcytozínov, ako aj smrti nádorových buniek.

Kľúčové slová: vitamín C, 5-hydroxymetylcytozín, TET, epigenetická regulácia, onkologické ochorenia

Úvod

Vitamín C, tiež známy ako kyselina L-askorbová, je vo vode rozpustný vitamín, ktorý je prirodzene prítomný v niektorých potravinách a tiež dostupný ako výživový doplnok. Pre ľudský organizmus, na rozdiel od väčšiny živočíchov, je vitamín C esenciálny a preto je základným diétnym komponentom [1]. V ľudských bunkách je vitamín C nezastupiteľný ako kofaktor potrebný na biosyntézu kolagénu, L-karnitínu a niekoľkých neurotransmiterov. Navyše, vitamín C sa tiež spolupodieľa na metabolizme bielkovín [1, 2] a regulácie aktivity transkripčných faktorov rodiny HIF, ako aj modulácie epigeneticky regulovanej expresie génov prostredníctvom spoluúčasti na oxidačnej demetylácii DNA a histónov [3]. Vitamín C je tiež dôležitým fyziologickým antioxidantom [3] a ukázalo sa, že regeneruje ďalšie antioxidanty v tele, vrátane alfa-tokoferolu [4].

Okrem biosyntetických a antioxidantných funkcií má vitamín C dôležitú úlohu v regulácii imunitnej odpovedi [4] a svojimi redukčnými vlastnosťami prispieva k vstrebávaniu nehémového železa z potravy [5]. Nedostatočný príjem vitamínu C je príčinou skorbutu, ktorý je charakterizovaný únavou alebo zmenenou náladou, rozsiahlou slabosťou spojivového tkaniva a krehkosťou kapilár [1, 2, 4, 6 – 9].

Orálny príjem vitamínu C ovplyvňuje jeho bunkovú a plazmatickú koncentráciu, pričom jeho celková koncentrácia v organizme je regulovaná prostredníctvom jeho absorpcie a exkrécie. Približne 70 až 90 % vitamínu C sa absorbuje pri jeho príjme 30-180 mg/deň. Avšak pri dávkach vyšších ako 1 g / deň klesne absorpcia na menej ako 50 % [4]. Výsledky farmakokinetických štúdií naznačujú, že perorálne dávky 1,25 g / deň kyseliny askorbovej produkujú priemerné maximálne koncentrácie vitamínu C v plazme 135 µmolov/l, ktoré sú približne dvojnásobne vyššie ako koncentrácie produkované konzumáciou 200-300 mg/deň kyseliny askorbovej zo stravy bohatej na vitamín C [10].

Celkový fyziologický obsah vitamínu C v organizme sa pohybuje od 300 mg až po približne 2 g [4]. Vysoké hladiny vitamínu C sú udržiavané v bunkách a tkanivách, a to hlavne v leukocytoch, v očiach, v nadobličkách, v bunkách hypofýzy a mozgu. Naproti tomu, koncentrácia vitamínu C je nízka v červených krvinkách a extracelulárnych tekutinách, ako sú plazma a sliny [4].

Význam vitamínu C v prevencii rakoviny

Výsledky epidemiologických štúdií poukazujú na skutočnosť, že zvýšená konzumácia ovocia a zeleniny je spojená so znížením rizika vzniku väčšiny typov rakoviny. Predpokladá sa, že tento efekt je aj dôsledkom ich vysokého obsahu vitamínu C [1, 2]. Vitamín C môže obmedziť tvorbu karcinogénov *in vivo* [2, 11], moduluje imunitnú odpoveď [2, 4] a prostredníctvom svojich antioxidantných vlastností sa môže spolupodieľať na zmenšení oxidačného poškodenia biomolekúl [1]. Výsledky väčšiny prípadových štúdií potvrdzujú inverznú súvislosť medzi príjmom vitamínu C a rakovinou pľúc, prsníka, hrubého čreva alebo konečníka, žalúdka, ústnej dutiny, hrtanu alebo hltanu a pažeráka [2, 4, 12, 13, 14]. Naopak, pokles plazmatickej koncentrácie vitamínu C bol pozorovaný u pacientov s nádorovými ochoreniami pri porovnaní so zdravými jedincami [2].

Na druhej strane je potrebné tiež poznamenať, že niekoľko epidemiologických štúdií, pri ktorých bol ako doplnok stravy použitý buď samotný vitamín C, alebo spolu s inými mikroživinami, nepriniesol žiadny prínos v prevencii rakoviny [15 – 23]. Podstatné obmedzenie pri interpretácii výsledkov mnohých z týchto štúdií spočíva v tom, že neboli stanovované koncentrácie vitamínu C pred alebo po podaní v krvi sledovaných osôb. Plazmatické a tkanivové koncentrácie vitamínu C sú u ľudí prísne kontrolované. Pri dennej dávke 100 mg alebo vyššej sa zdá, že bunky sú nasýtené a pri príjme najmenej 200 mg sa plazmatické koncentrácie zvyšujú len nepatrne [2, 10, 12, 15, 20]. Ak by sa koncentrácie vitamínu C u subjektov už pri vstupe do štúdie blížili k nasýteniu, dalo by sa očakávať, že dodatočná dávka vitamínu C už nebude mať žiadny vplyv na sledovaný parameter [12, 24, 25, 26].

Liečba rakoviny

V 70. rokoch štúdia Cameron, Campbell a Pauling naznačovali, že vysoká dávka vitamínu C má priaznivý vplyv na kvalitu života a prežitie u pacientov s terminálnou rakovinou [27, 28]. Niektoré následné štúdie - vrátane randomizovanej, dvojito zaslepenej, placebom kontrolovanej klinickej štúdie [29] - nepodporili tieto zistenia. V uvedenej štúdií pacienti s pokročilým kolorektálnym karcinómom, ktorí

užívali denne 10 g vitamínu C, nemali lepšie výsledky ako pacienti užívajúci placebo. Taktiež výskum vykonaný v roku 2003, ktorý hodnotí účinky vitamínu C u pacientov s rakovinou v pokročilom štádiu, nepreukázal žiaden protektívny prínos užívania vitamínu C pri vyhodnotení celkovej úmrtnosti [23]. Rozdiel v účinku vitamínu C môže byť dôsledkom spôsobu jeho podávania. Zatiaľ čo Cameron a jeho kolegovia používali kombináciu orálneho a intravenózneho podávania, v ostatných štúdiách bol vitamín C užívaný perorálne. Perorálne podávanie vitamínu C, dokonca aj vo veľmi veľkých dávkach, môže zvýšiť koncentráciu plazmatického vitamínu C maximálne len na 220 $\mu\text{mol/l}$, zatiaľ čo intravenózne podávanie môže vyvolať nárast plazmatickej koncentrácie až na hodnotu 26 000 $\mu\text{mol/l}$ [30, 31]. Milimolárne koncentrácie vitamínu C sú selektívne cytotoxické pre nádorové bunky *in vitro* [1, 32]. Výskum na myšiach naznačuje, že intravenózne podávanie vitamínu C môžu napomôcť s liečbou ťažko liečiteľných nádorov [33]. Vysoká koncentrácia vitamínu C môže pôsobiť ako prooxidant a vytvára peroxid vodíka, ktorý má selektívnu toxicitu voči rakovinovým bunkám [33 – 35]. Na základe týchto zistení a niekoľkých prípadových správ o pacientoch s pokročilým karcinómom, ktorí mali po intravenóznom podaní vysokej dávky vitamínu C pozoruhodne dlhú dobu prežitia [3, 30, 33, 36].

Vitamín C a syntéza 5-hydroxymetylcytozínu

Popri genetických a environmentálnych faktoroch sú tiež poruchy v epigeneticky regulovanej génovej expresii považované za jednu z hlavných príčin vzniku nádorových ochorení [37]. V rámci procesov spolupodieľajúcich sa na epigenetickej regulácii, sú metylačné modifikácie dusíkatých báz DNA a histónov jedny z najhlavnejších. Ku kovalentnej modifikácii DNA najčastejšie dochádza na cytozínových zvyškoch za vzniku 5-metylcytozínov (5-mC), označovaných ako metylóm, pričom narušenie dynamiky metylómu patrí medzi najskoršie a najčastejšie molekulárne zmeny počas karcinogenézy [3, 38]. Narušenie tvorby metylómu súvisí nie len s procesmi syntézy 5-mC, ale tiež jeho odstránenia [39]. Na aktívnom procese demetylácie DNA sa podieľajú enzýmy z rodiny „Ten-eleven“ translokáz (TET), ktoré patria medzi 2-oxoglutarát závislé dioxigenázy. Aktivita TET enzýmov je závislá na prítomnosti nehemového Fe^{2+} a O_2 , pričom môže byť aktivovaná vitamínom C [40]. Enzymatickým účinkom TET enzýmov je 5-mC postupne oxidovaný na 5-hydroxymetylcytozín (5-hmC), 5-formylcytozín (5-fC) až 5-karboxycytozín [39]. Predpokladá sa, že tvorba 5-hmC z 5-mC je dôležitá pre „znovu zapnutie“ transkripcie génov.

Výsledky nedávnych štúdií ukázali, že vo väčšine nádorových buniek, ak nie u všetkých, dochádza k poklesu obsahu 5-hmC báz v ich genóme [41 – 45]. Po prvý krát bola ako príčina poklesu 5-hmC identifikovaná narušená aktivita TET enzýmu v prípade leukémií [46]. Odvtedy mnohé štúdie preukázali koreláciu medzi stratou 5-hmC a rôznymi druhmi rakoviny, ako dôsledku nedostatočnej enzymatickej aktivity TET. Okrem mutácií v TET génoch, tiež znížená expresia TET, ako aj syntéza TET inhibítora – 2-hydroxyglutarátu – pomocou enzýmu izocitrát-dehydrogenázy IDH, či vnútrobunkový pokles koncentrácie vitamínu C sú dávané do súvisu so stratou 5-hmC v genómoch rakovinových buniek [47]. Úloha vitamínu C, ako reaktivátora aktivity TET enzýmov a obnovy premeny 5-mC na 5-hmC bola testovaná na niekoľkých nádorových bunkových modeloch *in vitro*. Výsledky týchto štúdií poukazujú na schopnosť vitamínu C zvýšiť aktivitu TET enzýmov, iniciovať syntézu 5-hmC a vyvolať smrť nádorových buniek [48]. Navyše, aktuálne prebiehajúce klinické testovania a publikované prípadové štúdie s intravenózne aplikovaným vitamínom C, ako protirakovinovým agensom u pacientov so solídnymi tumorami, poukazujú na jeho schopnosť pozitívne ovplyvniť prežívanie pacientov s niektorými typmi tumorov [49].

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- Li Y, Schellhorn HE. 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr*, 137:2171-84.
- Carr AC, Frei B. 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr*, 1999;69:1086-107.
- Gillberg L, Ørskov AD, Liu M, Harsløf LBS, Jones PA, Grønbaek K., 2018 Vitamin C - A new player in regulation of the cancer epigenome. *Semin Cancer Biol*. 51:59-67.
- Jacob RA, Sotoudeh G. 2002. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care*, 5:66-74.
- Gershoff SN. 1993. Vitamin C (ascorbic acid): new roles, new requirements? *Nutr Rev*, 51:313-26.
- Weinstein M, Babyn P, Zlotkin S. An orange a day keeps the doctor away: scurvy in the year 2000. *Pediatrics* 2001;108:E55.
- Wang AH, Still C. 2007. Old world meets modern: a case report of scurvy. *Nutr Clin Pract*, 22:445-8.
- Institute of Medicine. 2000. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: National Academy Press.
- Stephen R, Utecht T. 2001. Scurvy identified in the emergency department: a case report. *J Emerg Med*;21:235-7.
- Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Wesley RA, Levine M. 2004. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med*, 140:533-7.
- Hecht SS. 1997. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 216:181-91.
- Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, et al. 1996. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:3704-9.
- Zhang S, Hunter DJ, Forman MR, Rosner BA, Speizer FE, Colditz GA, et al. 1999. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 91:547-56.
- Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, Morrow J. 2001. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:9842-6.
- Kushi LH, Fee RM, Sellers TA, Zheng W, Folsom AR. 1996. Intake of vitamins A, C, and E and postmenopausal breast cancer. The Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol*, 144:165-74.
- Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, et al. 2004. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med*, 164:2335-42.
- Galan P, Briançon S, Favier A, Bertrais S, Preziosi P, Faure H, et al. 2005. Antioxidant status and risk of cancer in the SU.VI.MAX study: is the effect of supplementation dependent on baseline levels? *Br J Nutr*, 94:125-32.
- Gaziano JM, Glynn RJ, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, et al. 2009. Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*, 301:52-62.
- Lin J, Cook NR, Albert C, Zaharris E, Gaziano JM, Van Denburgh M, et al. 2009. Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk: a randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst*, 101:14-23.
- Taylor PR, Li B, Dawsey SM, Li JY, Yang CS, Guo W, et al. 1994. Prevention of esophageal cancer: the nutrition intervention trials in Linxian, China. Linxian Nutrition Intervention Trials Study Group. *Cancer Res*, 54(7 Suppl):2029s-31s.
- Qiao YL, Dawsey SM, Kamangar F, Fan JH, Abnet CC, Sun XD, et al. 2009. Total and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. *J Natl Cancer Inst*, 101:507-18.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. 2008. Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane Database Syst Rev* (3):CD004183.
- Coulter I, Hardy M, Shekelle P, Udani J, Spar M, Oda K, et al. 2003. Effect of the supplemental use of antioxidants vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 for the prevention and treatment of cancer. Evidence Report/Technology Assessment Number 75. AHRQ Publication No. 04-E003. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality.
- Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. 1999. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA*, 281:1415-23.
- Padayatty SJ, Levine M. 2006. Vitamins C and E and the prevention of preeclampsia. *N Engl J Med*, 355:1065.
- Padayatty SJ, Levine M. 2009. Antioxidant supplements and cardiovascular disease in men. *JAMA*, 301:1336.
- Cameron E, Campbell A. 1974. The orthomolecular treatment of cancer. II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer. *Chem Biol Interact*, 9:285-315.
- Cameron E, Pauling L. 1976. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73:3685-9.]
- Moertel CG, Fleming TR, Creagan ET, Rubin J, O'Connell MJ, Ames MM. 1985. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N Engl J Med*, 312:137-41.
- Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M. 2006. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ*, 174:937-42.
- Hoffer LJ, Levine M, Assouline S, Melnychuk D, Padayatty SJ, Rosadiuk K, et al. 2008. Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy. *Ann Oncol*, 19:1969-74.
- Shekelle P, Morton S, Hardy M. 2003. Effect of supplemental antioxidants vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 for the prevention and treatment of cardiovascular disease. Evidence Report/Technology Assessment No. 83 AHRQ Publication No. 03-E043. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality.
- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, et al. 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:11105-9.
- Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, et al. 2005. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:13604-9.
- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E, et al. 2007. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:8749-54.
- Levine M, Espey MG, Chen Q. 2009. Losing and finding a way at C: new promise for pharmacologic ascorbate in cancer treatment. *Free Radic Biol Med*, 47:27-9.
- Baylin SB, Ohm JE (2006). "Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction?". *Nature Reviews. Cancer*. 6 (2): 107–16.
- Murín R, Vidomanová E, Kowtharap BS, Hatok J, Dobrota D. 2017. Role of S-adenosylmethionine cycle in carcinogenesis. *Gen Physiol Biophys*, 36:513-520.

39. Murin R, Abdalla M, Murinová N, Hatok J, Dobrota D. 2018. The metabolism of 5-methylcytosine residues in DNA. *Physiol Res*, 67:383-389.
40. Vissers MCM, Das AB. 2018. Potential Mechanisms of Action for Vitamin C in Cancer: Reviewing the Evidence. *Front Physiol*, 9:809.
41. Chen ML, Shen F, Huang W, Qi JH, Wang Y, Feng YQ, Liu SM, Yuan BF. 2013. Quantification of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine in Genomic DNA from Hepatocellular Carcinoma Tissues by Capillary Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin Chem*, 59:824–32.
42. Jin SG, Jiang Y, Qiu R, Rauch TA, Wang Y, Schackert G, Krex D, Lu Q, Pfeifer GP. 2011. 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res*, 71:7360–5.
43. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R, Liu XS, Aravind L, Agarwal S, Maciejewski JP, Rao A. 2010. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, 468:839–43.
44. Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. 2012. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci*, 103:670–6.
45. Young JL, Züchner S, Wang G. 2015. Regulation of the Epigenome by Vitamin C. *Annu Rev Nutr*, 35:545-64.
46. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324:930–5.
47. Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, Xu W, Tan L, Hu Y, Zhan Q, Lee CW, Hu D, et al. 2012. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*, 150:1135–46.
48. Cimmino L, Dolgalev I, Wang Y, Yoshimi A, Martin GH, Wang J, Ng V, Xia B, et al. 2017. Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell*. 170:1079-1095
49. Cimmino L, Neel BG, Aifantis I. 2018. Vitamin C in Stem Cell Reprogramming and Cancer. *Trends Cell Biol*, 28:698-708.

DEREGULÁCIA BIELKOVÍN BCL-2 RODINY U MALÍGNÝCH OCHORENÍ

P. Račay¹, M. Brodňanová² a J. Hatok²

¹ *Biomedicínske centrum Martin, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)*

² *Ústav lekárskej biochémie, JLF UK v Martine*

Korešpondujúca osoba:

prof. RNDr. Peter Račay, PhD.
Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
Biomedicínske centrum Martin, Divízia Neurovedy
Malá Hora 4 - 036 01 Martin – SK
E-mail: racay@jfmed.uniba.sk

Abstrakt

Bielkoviny Bcl-2 rodiny sú kritickými regulátormi vnútornej (mitochondriálnej) dráhy apoptózy [2]. Deregulácia ich funkcií v rámci mitochondriálnej apoptózy predstavuje významný molekulový mechanizmus z hľadiska rozvoja malígnych ochorení a ich rezistencie na liečbu. V tejto práci sumarizujeme rôzne typy deregulácie bielkovín Bcl-2 rodiny spojené s rôznymi malígnymi ochoreniami a poukazujeme na možnosti vývoja nových liečiv využitím najnovších poznatkov o molekulárnych dráhach spojených s dereguláciou bielkovín Bcl-2 rodiny v malígnych bunkách.

Kľúčové slová: malígne ochorenia, apoptóza, mitochondrie, bielkoviny Bcl-2 rodiny

Úvod

Okrem iných bunkových funkcií [1] sú bielkoviny Bcl-2 rodiny kritickými regulátormi vnútornej (mitochondriálnej) dráhy apoptózy [2]. Z hľadiska rozvoja a liečby malígnych ochorení je rozhodujúcou funkciou ich esenciálna účasť v procese iniciácie vnútornej dráhy apoptózy. Bielkoviny Bcl-2 rodiny obsahujú vo svojej štruktúre aspoň jednu zo štyroch Bcl-2 homologických (BH) domén, označených BH1, BH2, BH3 a BH4. Bielkoviny sa prostredníctvom BH domén vzájomne špecificky ovplyvňujú za tvorby homo- a heterodimérov, ktoré zabezpečujú ich pro- alebo antiapoptotickú funkciu. Bielkoviny Bcl-2 rodiny môžu byť podľa funkcie a usporiadania BH domén rozdelené na proapoptotické a antiapoptotické [2]. Z hľadiska iniciácie mitochondriálnej apoptózy sú absolútne esenciálne dve proapoptotické bielkoviny, Bax a Bak, obsahujúce tri BH domény (BH1, BH2 a BH3), ktoré po aktivácii vytvárajú pór vo vonkajšej mitochondriálnej membráne. Vznik póru je spojený s uvoľnením cytochrómu c do cytoplazmy s následnou iniciáciou mitochondriálnej apoptózy. Do tejto skupiny patrí aj bielkovina Bok avšak jej úloha v mitochondriálnej apoptóze nie je úplne jasná [3].

Ďalšiu skupinu tvoria proapoptotické bielkoviny obsahujúce len BH3 doménu. Tieto fungujú ako prvotné senzory rôznych cytotoxických podnetov (hypoxia, poškodenie genómovej DNA, stres ER) spojených s iniciáciou vnútornej dráhy apoptózy. Do tejto skupiny patria: Bik, Hrk, Bim, Blk, Bad, Bid, Noxa a Puma [2]. Hlavnou úlohou bielkovín tejto skupiny je iniciovať bunkovú smrť na základe tvorby heterodimérov s antiapoptotickými bielkovinami (napr. Bcl-2 alebo Bcl-xL), čím dochádza k aktivácii Bax a/alebo Bak. Niektoré z nich (tBid a Bim) dokážu priamo aktivovať bielkovinu Bax [4].

Antiapoptotické bielkoviny (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1 a Mcl-1) obsahujúce všetky štyri BH domény fungujú hlavne ako endogénne inhibítory vnútornej dráhy apoptózy väzbou na proapoptotické bielkoviny Bax a Bak. Usporiadanie BH domén v trojrozmernej štruktúre týchto bielkovín vytvára na povrchu ich molekúl hydrofóbnu jamku, ktorá je nevyhnutná pre ich antiapoptotickú funkciu a pre naviazanie proapoptotických bielkovín prostredníctvom BH3 domény [2]. Okrem toho bielkoviny tejto rodiny obsahujú aj transmembránovú doménu, ktorá uchyťava tieto bielkoviny na vonkajší povrch najmä mitochondrií [4].

V zdravej bunke prípadne bunke, ktorá nie je odsúdená na bunkovú smrť, sú Bax a Bak neutralizované väzbou s antiapoptotickými bielkovinami Bcl-2 rodiny. V dôsledku niektorých cytotoxických podnetov dochádza k aktivácii proapoptotických bielkovín obsahujúcich len BH3 doménu. Mechanizmy aktivácie týchto bielkovín zahŕňajú ako aktiváciu na transkripčnej úrovni spojenú s ich zvýšenou expresiou (napr. Puma a Noxa prostredníctvom p53) tak aj aktiváciu na úrovni posttranslačných modifikácií (napr. fosforylácia Bad, štiepenie Bid). Aktivácia len BH3 domény obsahujúcich bielkovín je spojená najmä s ich väzbou na antiapoptotické bielkoviny Bcl-2 rodiny a uvoľnením Bax a Bak. Niektoré BH3 bielkoviny (tBid a Bim) však môžu Bax a Bak aktivovať aj priamo [4]. Bax nachádzajúci sa predovšetkým v cytoplazme zdravých buniek je v dôsledku pôsobenia apoptotických podnetov translokovaný na vonkajšiu mitochondriálnu membránu kde vytvorí veľké oligomérické komplexy [2]. V centrálnom nervovom systéme bol však Bax lokalizovaný hlavne v mitochondriách kde je jeho funkcia neutralizovaná pravdepodobne bielkovinou Bcl-XL [5]. Ako Bax tak aj Bcl-XL predstavujú hlavné bielkoviny Bcl-2 rodiny v zrelom mozgu [6]. K uvoľneniu Bax z väzby na Bcl-XL s následnou iniciáciou apoptózy dochádza po ischémii mozgu pravdepodobne prostredníctvom translokácie p53 do mitochondrií [7]. Bak bol jednoznačne dokumentovaný na vonkajšej mitochondriálnej membráne (VMM), kde je viazaný na Mcl-1 alebo na Bcl-XL. Po spustení procesu apoptózy dochádza vplyvom niektorých cytotoxických podnetov k degradácii Mcl-1 alebo je väzba medzi Bak – Mcl-1 a Bak – Bcl-XL rozrušená BH3 bielkovinami (napr. Noxa, Bim alebo Bik) [2]. Bak po uvoľnení, podobne ako Bax, vytvorí oligomérické komplexy. Oligomerizované Bax a Bak vytvárajú pór vo VMM, čo uľahčuje uvoľnenie cytochrómu c z medzimembránového priestoru mitochondrie do cytoplazmy, kde sa viaže na Apaf-1, vytvára apoptozóm, pričom dochádza k spusteniu apoptózy prostredníctvom aktivácie efektorovej kaspázy 9 a následne exekučnej kaspázy 3 [2]. Okrem cytochrómu c môžu byť z mitochondrií uvoľnené aj ďalšie proapoptotické bielkoviny, ako napr. AIF, endonukleáza G, ktoré môžu spustiť mitochondriálnu apoptózu nezávislú na kaspázach avšak táto dráha ako aj účasť bielkovín Bcl-2 rodiny nie je úplne jasná [8].

Regulácia exprese bielkovín Bcl-2 rodiny

Ako bolo uvedené vyššie iniciácia vnútornej dráhy apoptózy závisí na zmene rovnováhy medzi antiapoptotickými a len BH3 doménu obsahujúcimi bielkovinami Bcl-2 rodiny podmienenú expresiou príslušných génov a/alebo zmenou v interakcii spomínaných bielkovín, ktoré sú skôr výsledkom posttranslačných modifikácií príslušných bielkovín.

Transkripčná regulácia

Expresia BH3 bielkovín môže byť indukovaná na úrovni transkripcie rôznymi transkripčnými faktormi (TF), ktoré sú často cieľmi kľúčových onkogénnych dráh [3]. Typickým príkladom je účasť STAT5 a HIF-1 α pri regulácii transkripcie Mcl-1. NF- κ B, ako hlavná regulačná bielkovina zápalovej odpovede, a CHOP, spúšťaný stresom ER, predstavujú tiež zaujímavé TF kontrolujúce okrem iných génov aj transkripciu génov niektorých bielkovín Bcl-2 rodiny. Expresia Noxa a Puma je spúšťaná tumor supresorovou bielkovinou p53, ako odpoveď na poškodenie DNA [4]. Okrem samotných TF sa uplatňujú aj ich modifikácie. Transkripcia Bim je kontrolovaná prostredníctvom fosforylácie TF FOXO3a ERK kinázou a proteín kinázou B [9].

Posttranskripčná regulácia

Posttranskripčná regulácia exprese Bcl-2 bielkovín je pomerne komplexná, zahŕňajúca viacero mechanizmov [10] z ktorých sa najviac uplatňuje regulácia prostredníctvom miRNA. Expresia viacerých bielkovín Bcl-2 rodiny je regulovaná prostredníctvom rôznych miRNA [10]. Mcl-1 vykazuje z bielkovín Bcl-2 rodiny najvýraznejšiu posttranskripčnú reguláciu exprese. Translácia jej mRNA je okrem miRNA regulovaná aj PI3K-AKT-mTORC1 dráhou [3]. Z hľadiska vplyvu na aktivitu bielkoviny je významný alternatívny zostrih Bcl-X a Mcl-1 hnRNA kde dlhé varianty oboch bielkovín (Bcl-Xl a Mcl-1l) majú antipoptotickú funkciu pričom krátke varianty (Bcl-Xs a Mcl-1s) sú proapoptotické [10].

Posttranslačná regulácia

Z regulácii exprese a funkcií Bcl-2 bielkovín na úrovni posttranslačných modifikácií sa najviac uplatňuje ich fosforylácia, ubiquitinácia a degradácia ubiquitín proteazómovým systémom (UPS) [11].

Okrem transkripčnej regulácie fosforyluje ERK aj samotný Bim, pričom táto fosforylácia spôsobuje jeho disociáciu z väzby na Bcl-Xl či Mcl-1, uvoľnenie z mitochondrií a jeho následnú degradáciu UPS. Na druhej strane fosforylácia Mcl-1 ERK kinázou [9] a cyklín závislými kinázami zvyšuje stabilitu Mcl-1 [12]. Mcl-1 je tiež hyperfosforylovaná GSK3 β kinázou čo vedie k jej degradácii prostredníctvom UPS [9]. Fosforylácia bielkoviny BAD AKT kinázou vedie v cytoplazme k jej väzbe na bielkoviny 14-3-3 čím dochádza k neutralizácii jej pro-apoptotickej aktivity [9]. Proteolytické štiepenie bielkoviny Bid kaspázou 8 vedie k vzniku skrátenej formy tBid, ktorá dokáže priamo aktivovať bielkovinu Bax [4].

Tabuľka 1. Zmeny antiapoptotických Bcl-2 bielkovín u malígnych ochorení

Gén	Mechanizmus	Diagnóza	Ref.
Bcl-2	Nadexpresia	Neuroblastóm	15
	Nadexpresia	Folikulárny lymfóm	16
		Malo bunkový karcinóm pľúc	17
	Nadexpresia – translokácia génu	CLL	18, 19
	Nadexpresia – hypometylácia génu	CLL	19
		AML, ALL	20, 21
		Adenokarcinóm prsníka	22
Bcl-xl		Adenokarcinóm prostaty	23
		Adenokarcinóm pľúc	24
		Hepatocelulárny karcinóm	25
		Glióm	26
		Kolorektálny adenokarcinóm	27
		Karcinóm obličiek	28
		ALL	29
	Amplifikácia génu	Karcinóm pľúc	30, 31
Mcl-1		B-cell non-Hodgkin lymphomas	32
		Anaplastic large cell lymphoma	33
		Multiple myeloma	34
		Melanóm	35
	Amplifikácia génu	Karcinóm pľúc, karcinóm prsníka	30
	Nadexpresia	AML	36
Bcl-w		Gastric adenocarcinoma	37
		Colorectal adenocarcinoma	38
BFL-1	Nadexpresia	B-CLL, rôzne solídne nádory	39
		Melanóm	40

Deregulácia bielkovín Bcl-2 rodiny u malígnych ochorení

Na úrovni bielkovín Bcl-2 rodiny mechanizmy deregulácie mitochondriálnej apoptózy u malígnych ochorení zahŕňajú ako nadprodukcii antiapoptotických bielkovín Bcl-2 rodiny tak aj nefunkčnosť či zníženú expresiu proapoptotických bielkovín Bcl-2 rodiny. Pri nadprodukcii antiapoptotických bielkovín Bcl-2 rodiny sa uplatňujú najmä transkripčné (napr. translokácia, amplifikácia a hypometylácia génov), posttranskripčné a posttranslačné procesy [13]. Samotná bielkovina Bcl-2 bola objavená pri analýze genetických abnormalít spojených s rozvojom lymfómov [14]. U proapoptických bielkovín Bcl-2 rodiny sa uplatňuje strata génu či epigenetické utíšenie génu ako aj strata aktivity bielkoviny v dôsledku mutácii [13]. Deregulácia antiapoptotických a proapoptotických bielkovín Bcl-2 u rôznych malígnych ochorení je prehľadne uvedená v Tabuľke 1 a 2.

Tabuľka 2: Zmeny proapoptotických Bcl-2 bielkovín u malígnych ochorení

Gén	Mechanizmus	Diagnóza	Ref.
BIM	Delécia génu	Lymfóm plášťových buniek	41
	Epigenetické utíšenie	Burkittov lymfóm	42
PUMA	Strata génu	Rôzna	30
	Epigenetické utíšenie	Burkittov lymfóm	43
BMF	Strata génu	Karcinóm pľúc, karcinóm prsníka	44
BOK	Strata génu	Rôzna	30
BAX	Mutácie génu	Kolorektálny karcinóm, ALL	45, 46, 47

Záver

Výskum bielkovín Bcl-2 rodiny za posledných 30 rokov viedol nielen k odhaleniu ich fyziologických funkcií a spojitosti s malígnymi ochoreniami ale aj k dizajnu niekoľkých látok schopných zabíjať malígne bunky [48]. V rôznych fázach klinického výskumu pri rôznych diagnózach sa nachádza niekoľko perspektívnych molekúl pričom venetoclax, molekula schopná väzby na bielkovinu Bcl-2, bola schválená na liečbu CLL s 17p deléciou a AML.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Hatok J, Račay P. Bcl-2 family proteins: master regulators of cell survival. *Biomol Concepts*. 2016; 7:259-270.
- [2] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15:49-63.
- [3] Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13:455-65.
- [4] Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ*. 2015; 22:1071-80.
- [5] Pilchová I, Klacanova K, Chomova M, Tatarkova Z, Dobrota D, Racay P. Possible contribution of proteins of Bcl-2 family in neuronal death following transient global brain ischemia. *Cell Mol Neurobiol*. 2015; 35:23-31.
- [6] Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, Reed JC. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1995; 15:6364-76.
- [7] Racay P, Chomova M, Tatarkova Z, Kaplan P, Hatok J, Dobrota D. Ischemia-induced mitochondrial apoptosis is significantly attenuated by ischemic preconditioning. *Cell Mol Neurobiol*. 2009; 29:901-8.
- [8] Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11:621-32.
- [9] Balmano K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ*. 2009; 16:368-77.
- [10] Cui J, Placzek WJ. Post-Transcriptional Regulation of Anti-Apoptotic BCL2 Family Members. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 pii: E308.
- [11] Kutuk O, Letai A. Regulation of Bcl-2 family proteins by posttranslational modifications. *Curr Mol Med*. 2008; 8:102-18.
- [12] Štefaníková A, Klačanová K, Pilchová I, Hatok J, Račay P. Cyclin-dependent kinase 2 inhibitor SU9516 increases sensitivity of colorectal carcinoma cells Caco-2 but not HT29 to BH3 mimetic ABT-737. *Gen Physiol Biophys*. 2017; 36:539-547.
- [13] Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16:99-109.
- [14] Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984; 224:1403–1406.
- [15] Castle VP, Heidelberger KP, Bromberg J, Ou X, Dole M, Nuñez G. Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2 in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am J Pathol* 1993; 143:1543–1550.
- [16] Pepper C, Hoy T, Bentley P. Elevated Bcl-2/Bax are a consistent feature of apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and are correlated with in vivo chemoresistance. *Leuk Lymphoma* 1998; 28:355–361.
- [17] Jiang SX, Sato Y, Kuwao S, Kameya T. Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J Pathol* 1995; 177:135-8.
- [18] Adachi M, Tefferi A, Greipp PR, Kipps TJ, Tsujimoto Y. Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1990; 171:559–64.
- [19] Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1993; 82:1820-1828.
- [20] Klobusická M, Kusenda J, Babusíková O. Expression of p53 and bcl-2 proteins in acute leukemias: an immunocytochemical study. *Neoplasma* 2001; 48:489-95.
- [21] Molica S, Mannella A, Dattilo A, Levato D, Iuliano F, Peta A, Consarino C, Magro S. Differential expression of BCL-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis. *Haematologica* 1996; 81:302-9.
- [22] Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G. The prevalence of BCL-2 immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates, with particular reference to oestrogen receptor status. *Virchows Arch* 1994; 424:47-51.

- [23] Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996; 148:1567-76.
- [24] Singhal S, Amin KM, Krulkitis R, Marshall MB, Kucharczuk JC, DeLong P, Litzky LA, Kaiser LR, Albelda SM. Differentially expressed apoptotic genes in early stage lung adenocarcinoma predicted by expression profiling. *Cancer Biol Ther* 2003; 2:566-71.
- [25] Watanabe J, Kushihata F, Honda K, Mominoki K, Matsuda S, Kobayashi N. BclxL overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 21:515-9.
- [26] Krajewski S, Krajewska M, Ehrmann J, Sikorska M, Lach B, Chatten J, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *Am J Pathol* 1997; 150:805-14.
- [27] Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1996; 56:2422-7.
- [28] Gobé G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest* 2002; 20:324-32.
- [29] Račay P, Hatok J, Hudeček J, Chudej J, Jurečková J, Dobrota D. Transcription of genes of p53-dependent apoptosis in acute leukaemia. *Int J Mol Med* 2008; 22:833-9.
- [30] Beroukhi R, Mermel C, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010; 463:899–905.
- [31] Tonon G, Wong KK, Maulik G, Brennan C, Feng B, Zhang Y et al. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9625–9630.
- [32] Cho-Vega JH, Rassidakis GZ, Admirand JH, Oyarzo M, Ramalingam P, Paraguya A, McDonnell TJ, Amin HM, Medeiros LJ. MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 2004; 35:1095-100.
- [33] Rassidakis GZ, Lai R, McDonnell TJ, Cabanillas F, Sarris AH, Medeiros LJ. Overexpression of Mcl-1 in anaplastic large cell lymphoma cell lines and tumors. *Am J Pathol* 2002; 160: 2309-10.
- [34] Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, Moreau P, Le Gouill S, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* 2005; 19: 1248-52.
- [35] Wong RP, Khosravi S, Martinka M, Li G. Myeloid leukemia-1 expression in benign and malignant melanocytic lesions. *Oncol Rep* 2008; 19: 933-7.
- [36] Xiang Z, Luo H, Payton JE, Cain J, Ley TJ, Opferman JT et al. Mcl1 haploinsufficiency protects mice from Myc-induced acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2010; 120:2109–2118.
- [37] Lee HW, Lee SS, Lee SJ, Um HD. Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Cancer Res* 2003; 63:1093-100.
- [38] Wilson JW, Nostro MC, Balzi M, Faraoni P, Cianchi F, Becciolini A, Potten CS. Bcl-w expression in colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2000; 82:178-85.
- [39] Park IC, Lee SH, Whang DY, Hong WS, Choi SS, Shin HS et al. Expression of a novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, in various human cancers and cancer cell lines. *Anticancer Res* 1997; 17:4619–4622.
- [40] Hind CK, Carter MJ, Harris CL, Chan HT, James S, Cragg MS. Role of the pro-survival molecule Bfl-1 in melanoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 59:94-102.
- [41] Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 2005; 24:1348–1358.
- [42] Richter-Larrea JA, Robles EF, Fresquet V, Beltran E, Rullan AJ, Agirre X et al. Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma. *Blood* 2010; 116:2531–2542.
- [43] Garrison SP, Jeffers JR, Yang C, Nilsson JA, Hall MA, Reh JE et al. Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 2008; 28:5391–5402.
- [44] Wick W, Petersen I, Schmutzler RK, Wolfarth B, Lenartz D, Bierhoff E et al. Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* 1996; 12:973–978.
- [45] Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC et al. Somatic frameshift mutations in the bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275:967–969.
- [46] Inoue K, Kohno T, Takakura S, Hayashi Y, Mizoguchi H, Yokota J. Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leuk Res* 2000; 24:255–62.
- [47] Gil J, Yamamoto H, Zapata JM, Reed JC, Perucho M. Impairment of the proapoptotic activity of Bax by missense mutations found in gastrointestinal cancers. *Cancer Res* 1999; 59:2034–7.
- [48] Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. (2017) From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 16:273-284.

ETIOLÓGIA, PATOGENÉZA A LIEČBA NÁDOROV MOZGU

P. Račay¹ a J. Hatok²

¹ *Biomedicínske centrum Martin, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)*

² *Ústav lekárskej biochémie, JLF UK v Martine*

Korešpondujúca osoba:

prof. RNDr. Peter Račay, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Biomedicínske centrum Martin, Divízia Neurovedy

Malá Hora 4 - 036 01 Martin – SK

E-mail: racay@jfmed.uniba.sk

Abstrakt

Primárne nádory centrálneho nervového systému (CNS) sú skôr zriedkavosťou. Najčastejšie sa vyskytujú nádory mozgu a z nich je najčastejším multiformný glioblastóm (GBM). GBM je vysilujúca choroba s veľmi zlou prognózou, krátkym medianom prežívania pacientov a veľmi obmedzenou odozvou na liečbu. GBM vykazuje veľmi komplexnú patogenézu zahŕňajúcu mutácie a zmeny rôznych kľúčových bunkových dráhach, ktoré hrajú úlohu v proliferácii, prežívaní, a migrácii buniek ako aj v angiogenéze. Z tohto dôvodu je lepšie poznanie patogenézy GBM rozhodujúce v snahe vývoja efektívnych liečebných postupov zameraných na zvýšenie prežívania pacientov. V tejto práci popisujeme zmeny spojené s patogenézou GBM a sumarizujeme terapeutické stratégie cielené na bunkové dráhy, ktoré sú najviac pozmenené u GBM.

Kľúčové slová: nádory mozgu, cielená terapia, signálne dráhy

Úvod

Primárne nádory centrálneho nervového systému (CNS) sú skôr zriedkavosťou. Najčastejšie sa vyskytujú nádory mozgu. V roku 2006 bolo v Slovenskej republike diagnostikovaných 199 mozgových nádorov u mužov, čo tvorí 1,5% všetkých malígnych ochorení, a 169 u žien, 1,3% všetkých malígnych ochorení [1]. Oveľa zriedkavejšie sú nádory miechy a iných častí CNS, kde bolo v roku 2006 zistených len 6 prípadov u mužov a 7 prípadov u žien. Nádory CNS majú vo všeobecnosti zlú prognózu o čom svedčí aj počet úmrtí a relatívna miera prežívania. V roku 2006 bolo zaznamenaných 172 úmrtí v dôsledku nádorov mozgu u mužov, čo tvorí 2,54% všetkých úmrtí mužov na malígne ochorenia, a 137 úmrtí u žien čo je 2,8% všetkých úmrtí žien na malígne ochorenia [2]. Relatívna miera 5-ročného prežívania pacientov s diagnostikovaným nádorom CNS sa však výrazne líši v rámci jednotlivých diagnóz [3]. Najagresívnejším a najčastejším typom nádoru mozgu je GBM kde relatívna miera 5-ročného prežívania pacientov je 2,4%.

Zvyšovanie strednej doby života sa podpisuje aj na zvyšovaní incidencie nádorov CNS, keďže incidencia nádorov mozgu výrazne stúpa s vekom (z 1,7/100 000 pre detí a adolescentov po 19,2/100 000 pre populáciu 60 – 79-ročných) [3].

Etiológia, rizikové faktory a patogenéza nádorov mozgu

Etiológia primárnych nádorov CNS nie je úplne známa. Jediným jednoznačne identifikovaným kauzálnym faktorom je v malej miere ionizujúce žiarenie, ale najmä genetické pozadie, zodpovedné za vrodené syndrómy, ktoré sú spojené so zvýšeným rizikom nádorov CNS. Ich prehľad je uvedený v tabuľke 1. Vo všeobecnosti sú to autozomálne dominantné syndrómy [4] postihujúce aj iné orgány [3] a mnohé z nich sú spojené so zreteľnými kožnými prejavmi (phakomatoses). Najčastejším z týchto syndrómov je neurofibromatóza typu 1 s prevalenciou 1:3 000 [5], zatiaľ čo neurofibromatóza typu 2 má incidenciu okolo 1:40 000 [6].

U spontánnych nádorov CNS bol pozorovaný zvýšený výskyt genetických a epigenetických zmien, najmä na úrovni signálnych dráh, ktoré kontrolujú proliferáciu buniek (tyrozín kinázové receptory a ich efektorové bielkoviny), bunkový cyklus (cyklín závislé kinázy a retinoblastomová bielkovina (RB)) a tumorsupresorové dráhy (p53) [7]. Prehľad najčastejších genetických a epigenetických zmien pozorovaných u glioblastómov je uvedený v tabuľke 2.

Genetické zmeny a ich frekvencia u ostatných typov nádorov nie sú tak podrobne popísané ako u gliómov čo je pravdepodobne spôsobené ich nízkou incidenciou. Najčastejších genetické zmeny u niektorých ďalších typov nádorov mozgu boli pozorované najmä u génov pre rastové faktory a ich receptory (napr. rastový faktor odvodený od doštičiek, PDGF), bielkoviny kontrolujúce bunkový cyklus a onkogénny (N-myc, C-myc) [3].

Na rozdiel od iných nádorových ochorení, v prípade nádorov CNS neexistuje v súčasnosti dôkaz, že nádorom CNS možno predchádzať zmenou životného štýlu. V prípade lymfómov CNS je imunosupresia považovaná za príčinu rozvoja tohto nádorového ochorenia. Riziko rozvoja nádorového ochorenia CNS závisí na veku a pohlaví s vyšším . Okrem toho sa pozoroval vzťah k sociálnemu stavu kde nádory

mozgu sú častejšie u bohatých ľudí [10] a podobný trend je platný aj pre úmrtnosť. Na druhej strane je opačný trend pozorovaný u metastáz do mozgu [11].

Tabuľka 2: Familiárne syndrómy spojené so zvýšeným rizikom nádorov CNS (podľa [3], [4], [8] a [9]).

Syndróm	Gén	Funkcia	Lokalizácia	Klinický prejav na úrovni CNS
Neurofibromatóza typu 1	NF1	Negatívny regulátor ras	17q11	Neurofibrómy, tumor nervových pošiev, gliómy optického nervu, astrocytóm
Neurofibromatóza typu 2	NF2	Interakcia cytosket-membrána	22q12	Bilaterálne vestibulárne schwanómy, mnohopočetné meningiómy, astrocytómy
von Hippel–Lindau	VHL	Ubikvitín ligáza	3p25	Hemangioblastómy
Tuberózna skleróza	TSC1 TSC2	Tumor supresor	9q34 16p13	Subependymálny veľkobunkový astrocytóm, kortikálne tuberkuly
Li–Fraumeni	TP53	Tumor supresor	17p13	Astrocytómy/neuroektodermálne nádory
Cowden	PTEN	Tumor supresor	10q23	Dysplastický gangliocytóm mozočka
Turcot	APC HMLH1 HPSM2		5q21 3p21 7p22	Meduloblastóm Glioblastóm
Gorlin	PTCH	Tumor supresor	9q22	Meduloblastóm

Geografické rozdiely v incidencii nádorov mozgu sú menšie než pre väčšinu ľudských malignít, pričom menej rozvinuté krajiny vykazujú nižšiu incidenciu ako viac rozvinuté krajiny. Je dokumentované, že komunity afrického alebo ázijského pôvodu vykazujú nižšiu incidenciu ako komunity kaukazianskeho pôvodu [13]. V rámci Slovenska neexistujú významné rozdiely v incidencii nádorov CNS medzi jednotlivými regiónmi [2].

Cielenie liečby nádorov mozgu

Liečba nádorov mozgu závisí na ich anatomickej lokalizácii a patologickom type. Nádory v rámci lebky avšak mimo mozgu, napríklad meningiómy, môžu byť často kompletne chirurgicky odstránené s veľmi dobrou prognózou. Nádory lokalizované priamo v mozgu, napríklad gliómy, môžu byť kompletne chirurgicky odstránené len vo vzácných prípadoch vzhľadom na ich vzťah ku kritickým štruktúram mozgu či infiltrácii okolitého tkaniva. V závislosti na type nádoru (napríklad gliómy vysokého stupňa) môže byť prínosom chirurgické odstránenie, rádioterapia, chemoterapia a ich kombinácie [3]. V rámci chemoterapie sa stále využívajú klasické cytostatiká na báze nitromočoviny (karmustín, lomustín), platínové deriváty (cisplatina, karboplatina) a alkylačné činidlá (prokarbazín, temozolomid) a ich kombinácie [3] [14].

Tabuľka 3: Najčastejšie genetické a epigenetické zmeny u gliómov (podľa [7] a [12]).

Gén	Funkcia	Zmena/Frekvencia
Signálna dráha rastový receptor/RAS/fosfoinozitol 3-fosfát kináza / 88%		
EGFR	Receptor pre EGF	Mutácie/amplifikácia 45%
ERBB2	Receptor pre EGF	Mutácie 8%
PDGFRA	Receptor pre PDGF	Mutácie 13%
NF1	Inhibítor RAS	Mutácie/homozygótne delécie 18% Hypermetylácia
PI3K	Proteín kináza, kontrola proliferácie a prežívania buniek	Mutácie/homozygótne delécie 15%
PTEN	Proteín fosfatáza, inhibítor PI3K	Mutácie/homozygótne delécie 36%
Signálna dráha p53 / 87%		
CDKN2A/ARF	Inhibítor MDM2	Homozygótne delécie/mutácie 49%
MDM2	Inhibítor p53	Amplifikácia 14%
MDM4	Inhibítor p53	Amplifikácia 7%
TP53	Kontrola bunkového cyklu Oprava DNA Iniciácia apoptózy	Mutácie/homozygótne delécie 35%
Signálna dráha RB / 78%		
CDKN2A	Inhibítor CDK4	Homozygótne delécie/mutácie 52%
CDKN2B	Inhibítor CDK4	Homozygótne delécie 47%
CDK4	Proteín kináza, prechod z G1 do S fázy	Amplifikácia 11%
RB1	Prechod z G1 do S fázy	Homozygótne delécie/mutácie 11% Hypermetylácia
Iné dráhy		
MGMT	Oprava DNA/demetylácia guanínov	Hypermetylácia/ 21%

Najčastejším cieľom liečby GBM sú rastové receptory a ich tyrozín kinázové aktivity či efektorové bielkoviny [7]. V nedávnej dobe bol FDA schválený bevacizumab (monoklonálna protilátka voči VEGF) na liečbu GBM [15]. Napriek významným a častým genetickým zmenám na úrovni EGFR a následnej signálnej kaskády sú inhibítory tyrozín kináz zatiaľ len v štádiu klinických skúšok pričom niektoré z nich (erlotinib, gefitinib) nevykázali v klinických skúškach významné výsledky [7]. Podobne je to aj s inými látkami, ktoré sú zamierené na ďalšie ciele hrajúce úlohu pri kontrole proliferácie a prežívania buniek [7]. Podobne ako inhibítory tyrozín kináz aj inhibítory PI3K (sonosilib) či mTOR (temsirolimus, sirolimus a everolimus) nevykazujú významnú účinnosť v klinických skúškach. Zatiaľ najoptimistickejšie výsledky vykázal duálny inhibítor PI3K/mTOR (GDC0084) [16]. Ďalšie ciele liečby zahŕňajú Ras a Raf signálnu kaskádu, proteín kinázu C, p53, RB, TGF- β a O(6)-metylguanín-DNA metyltransferázu (MGMT) [7]. Účinnosť liečby GBM je v súčasnosti pomerne nízka, čiastočne predlžuje život, ale nezvyšuje pravdepodobnosť vyliečenia. Táto skutočnosť je pravdepodobne dôsledkom vysokej bunkovej diverzity

a heterogenity nádorov mozgu s čím súvisí nutnosť podrobnejšej genetickej a molekulárno-biologickej analýzy konkrétnych nádorov a výber optimálnej cielenej liečby zohľadňujúcej individuálne charakteristiky nádorov. Napríklad účinnosť chemoterapie na báze alkylačných činidiel ako aj jej kombinácie s rádioterapiou je významne zvýšená v prípade metylácie promótoru MGMT [17]. Enzým MGMT, ktorý sa zúčastňuje opráv DNA priamou dealkyláciou alkylovaného guanínu, antagonizuje toxické efekty alkylačných činidiel. Metylácia MGMT promótoru predstavuje kľúčový mechanizmus potlačenia transkripcie MGMT génu a je spojená s priaznivou prognózou u pacientov s potvrdenou diagnózou glioblastómu, ktorí sú liečení chemoterapiou na báze alkylačných činidiel. Hypermetylácia promótoru MGMT bola pozorovaná u 74% pacientov s diagnostikovaným glioblastómom, ktorí s uvedenou diagnózou prežili viac ako 3 roky [18]. Metyláciu promótoru MGMT možno pomerne jednoducho vyšetriť bisulfidovou metódou s využitím PCR [19] avšak súčasné práce upozorňujú na nutnosť validácie takto získaných výsledkov pomocou imunohistochemického vyšetrenia tkaniva s cieľom stanovenia hladiny expzie MGMT v nádorových bunkách [20]. S ohľadom na personalizovanú liečbu glioblastómov súčasné klinicko-experimentálne výsledky naznačujú nevyhnutnosť testovania minimálne 1p/19q chromozomálnych kodelécii a metylačného statusu MGMT promótoru [21]. Napriek skutočnosti, že amplifikácia EGFR ako aj nepriaznivé mutácie tohto génu sú najčastejším genetickým prejavom GBM (tabuľka 2) nie je testovanie týchto zmien považované v súčasnosti za významné vzhľadom na neúspešnosť inhibítorov EGFR v klinických skúškach [7] a [22]. Cytostatickú liečbu možno optimalizovať aj priamym in vitro meraním citlivosti nádorových buniek na cytostatiká [23]. Aj napriek priaznivým výsledkom dosiahnutým v minulosti [24], v súčasnosti nie sú metódy vyšetrovania in vitro citlivosti súčasťou rutínnej klinickej praxe.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

1. Hlava P, Obšitníková A, Pleško I, Baráková A, Diba CS. Zhubné nádory v SR - vybrané epidemiologické ukazovatele. Národné centrum zdravotníckych informácií 2010.
2. Diba CS, Pleško I, Hlava P. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2006. Národné centrum zdravotníckych informácií 2010.
3. Kalina P, Jurga L'M. Nádory centrálneho nervového systému. Klinická a radiačná onkológia. Druhý diel, s. 789-806. Osveta Martin 2010.
4. Kleihues P, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press 2000.
5. Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type I. Am J Med Genet. 1999, 89:1–6.
6. Evans DGR, Sainio M, Baser ME. Neurofibromatosis type 2. J Med Genet. 2000, 37:897–904.
7. Pearson JRD, Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. Signal Transduct Target Ther. 2017 Sep 29;2:17040. doi: 10.1038/sigtrans.2017.40. eCollection 2017.
8. Ellison D, Chimelli L, Harding B a spol. Neuropathology. 2nd edition. London: Mosby 2004.
9. Pan E, Uyebara-Lock JH, Nicholas MK. Familial brain tumour syndromes. In: Steele GD, Phillips TL, Chabner BA, editors American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology: Brain Cancer. London: BC Decker Inc 2002.
10. Quinn M, Babb P, Brock A a spol. Brain. Cancer trends in England and Wales 1950–1999: studies on medical and population subjects No. 66. London: The Stationery Office 2001, 34–39.
11. Counsell CE, Collie DA, Grant R. Incidence of intracranial tumours in the Lothian region in Scotland: 1989–90. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1996, 61:143–150.

12. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008, 455:1061-1068.
13. International Agency for Research on Cancer. Tumours of the Nervous System. In: Stewart BW, Kleihues P, editors. World cancer report. Lyon: IARC Press 2003.
14. Kalina P. Chemoterapia nádorov centrálnej nervovej sústavy. *Onkológia (Bratisl.)*. 2010, 5:128–131.
15. Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin®) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *The Oncologist*. 2009, 14:1131-1138.
16. Heffron TP, Ndubaku CO, Salphati L, Alicke B, Cheong J, Drobnick J, Edgar K, Gould SE, Lee LB, Lesnick JD, Lewis C, Nonomiya J, Pang J, Plise EG, Sideris S, Wallin J, Wang L, Zhang X, Olivero AG. Discovery of Clinical Development Candidate GDC-0084, a Brain Penetrant Inhibitor of PI3K and mTOR. *ACS Med Chem Lett*. 2016 Feb 16;7(4):351-6.
17. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, Bekele BN, Aldape KD. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2010, 12:116-121.
18. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G; German Glioma Network. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*. 2007, 130:2596-2606.
19. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000, 343:1350-1354.
20. Lalezari S, Chou AP, Tran A, Solis OE, Khanlou N, Chen W, Li S, Carrillo JA, Chowdhury R, Selfridge J, Sanchez DE, Wilson RW, Zurayk M, Lalezari J, Lou JJ, Ormiston L, Ancheta K, Hanna R, Miller P, Piccioni D, Ellingson BM, Buchanan C, Mischel PS, Nghiemphu PL, Green R, Wang HJ, Pope WB, Liao LM, Elashoff RM, Cloughesy TF, Yong WH, Lai A. Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neuro Oncol*. 2013, 15:370-381.
21. Weller M, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, Wick W, Reifenberger G. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol*. 2012, 14:iv100-108.
22. Taylor TE, Furnari FB, Cavenee WK. Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. *Curr Cancer Drug Targets*. 2012, 12:197-209.
23. Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med*. 2009, 9:1-7.
24. Sargent JM. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. *Recent Results Cancer Res*. 2003, 161:13-25.

NOVÉ CIELE LIEČBY MALÍGNÝCH OCHORENÍ

P. Račay¹, Z. Tatarková² a J. Hatok²

¹ *Biomedicínske centrum Martin, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)*

² *Ústav lekárskej biochémie, JLF UK v Martine*

Korešpondujúca osoba:

prof. RNDr. Peter Račay, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Biomedicínske centrum Martin, Divízia Neurovedy

Malá Hora 4 - 036 01 Martin – SK

E-mail: racay@jfmed.uniba.sk

Abstrakt

Účinnosť liečby malígnych ochorení je stále pomerne nízka (30-50%), pričom u väčšiny diagnóz dokáže súčasná liečba len čiastočne predĺžiť život pacientov ale nezvyšuje pravdepodobnosť ich úplného vyliečenia. Z uvedených faktov vyplýva, že súčasný biomedicínsky výskum musí byť z hľadiska malígnych ochorení orientovaný aj na odhaľovanie nových cieľových bielkovín s následným vývojom nových molekúl na nich namierených. V tejto práci sa venujeme novým cieľom liečby malígnych ochorení z hľadiska ich súčasných možností a perspektívy do budúcnosti.

Kľúčové slová: malígne ochorenia, cielená terapia, metabolizmus, epigenetika, syntéza a spracovanie bielkovín

Úvod

Malígne ochorenia patria k druhej najčastejšej príčine smrti ľudí v ekonomicky rozvinutých krajinách, vrátane Slovenska. Miera ich incidencie za 20 rokov stúpila v Slovenskej republike v priemere o cca 30 %, pričom sa predpokladá stúpajúca tendencia do roku 2015. Od polovice 90. rokov minulého storočia bol však v SR pozorovaný pokles úmrtnosti na malígne ochorenia, pričom predikčné modely naznačujú mierny pokles úmrtnosti na nádorové ochorenia v slovenskej populácii aj v nasledujúcich rokoch [1]. V rokoch 2000-2004 došlo v Slovenskej republike v porovnaní s rokmi 1980-1984 k významnému zvýšeniu relatívnej miery 5-ročného prežívania pacientov so zhubnými nádormi hrubého čreva, konečníka, prostaty, prsníka a kože avšak relatívna miera 5-ročného prežívania pacientov so zhubnými nádormi žalúdka, pankreasu, pľúc a maternice sa významne nezmenila [2]. Aj napriek dlhodobému výskumu a vývoju nových liečiv je účinnosť liečby malígnych ochorení pomerne nízka (30-50%), pričom u väčšiny diagnóz dokáže súčasná liečba len čiastočne predĺžiť život pacientov ale nezvyšuje pravdepodobnosť ich úplného vyliečenia. Z uvedených faktov vyplýva, že súčasný biomedicínsky výskum musí byť z hľadiska malígnych ochorení orientovaný dvoma smermi:

1. výskum a vývoj nových molekúl, postupov a liečebných protokolov, ktoré selektívne ničia malígne bunky pričom sú šetrné k normálnym bunkám
2. vypracovanie nových diagnostických algoritmov umožňujúcich jednak včasnejšiu diagnostiku malígnych ochorení v menej agresívnom štádiu ako aj zohľadnenie personálnych individualít konkrétnych pacientov s hlavným cieľom výberu optimálnej liečby.

Je nutné podotknúť, výskum a vývoj nových molekúl nezahŕňa len molekuly namierené na už známe ciele protinádorovej liečby ale aj odhaľovanie nových cieľových bielkovín s následným vývojom nových molekúl na nich namierených. V tejto práci sa venujeme novým cieľom liečby malígnych ochorení z hľadiska ich súčasných možností a perspektívy do budúcnosti. Vzhľadom na značnú rozmanitosť nádorov sa budeme orientovať najmä na metabolizmus, epigenetiku a syntézu a kontrolu kvality bielkovín.

Metabolizmus malígnych buniek

Warburgov efekt spočívajúci v schopnosti malígnych buniek vychytávať a oxidovať glukózu najmä anaeróbnou glykolýzou bez ohľadu na prítomnosť kyslíka bol prvou popísanou biochemickou charakteristikou malígnych buniek. Hoci tento efekt nebol doposiaľ na molekulovej úrovni spoľahlivo vysvetlený, predpokladá sa, že tento efekt nie je príčinou ale dôsledkom malígnej transformácie buniek [3] a je výsledkom priameho vplyvu určitých mutovaných bielkovín, ako napríklad p53, na energetický metabolizmus bunky [4]. Zvýšené vychytávanie a oxidácia glukózy koreluje s agresivitou nádoru a zlou prognózou ochorenia. Okrem zmien na úrovni glykolýzy dochádza v malígnych bunkách k rôznym iným metabolickým zmenám [5] vrátane mitochondrií [6]. Z hľadiska energetického metabolizmu bolo zaujímavým zistením odhalenie mutácií v génoch pre izocitrát dehydrogenázu v spojení s akútnou myeloidnou leukémiou [7] a nádormi mozgu. Izocitrát dehydrogenáza 2 (IDH2), enzým Krebsovho cyklu, katalyzuje oxidatívnu dekarboxyláciu izocitrátu na 2-oxoglutarát pričom dochádza k redukcii NAD⁺ na NADH. Jej izoforma (IDH1), lokalizovaná v cytoplazme, katalyzuje tú istú reakciu avšak za vzniku NADPH. Klinicky významné mutácie týchto enzýmov vedú k produkcii onkometabolitu 2-hydroxyglutarátu (2OHG), ktorý v jadrách postihnutých buniek spôsobuje epigenetické zmeny podporujúce rast nádorov [7]. Mutácie IDH a hladiny 2OHG v plazme sú tiež významným diagnostickým a prognostickým markerom [8]. Zatiaľ čo u akútnych leukémii sú mutácie IDH1 a IDH2 spojené s agresívnejšou formou ochorenia [7] v prípade glioblastómov vykazujú pacienti s mutovanou IDH1 dvojnásobné celkové prežívanie v porovnaní s pacientami s nemutovanou IDH1 [9]. V prípade akútnych myeloidných leukémií boli na ich liečbu u pacientov s dokázanou mutáciou IDH schválené ivosidenib, inhibítor mutovanej IDH1, a enasidenib, inhibítor mutovanej IDH2. Možnosti liečby malígnych ochorení ovplyvnením energetického metabolizmu sa intenzívne študujú najmä na úrovni mitochondrií [10].

Epigenetické ciele

Počas malígnej transformácie nedochádza len k mutáciám genómovej DNA (gDNA) malígnych buniek aj k akumulácii epigenetických zmien najmä metylácie CpG ostrovov v promótorových oblastiach

a imprintingu príslušných génov [11]. Metylácie gDNA a následný imprinting nemusia byť nevyhnutne klinicky nepriaznivé. Metylácia promótorovej oblasti génu pre O-6-metylguanín metyltransferázu (MGMT) vedie k imprintingu tohto génu a následne k nízkym hladinám MGMT je spojená s lepšou odpoveďou glioblastómov na štandardnú liečbu využívajúcu temozolomid [12]. Okrem epigenetických zmien samotnej gDNA dochádza aj z zmenám na úrovni histónov. Už spomínaný 2OHG je inhibítorom demetyláz histónov závislých na 2-oxoglutaráte [Medeiros]. Z epigenetického hľadiska sú v súčasnosti asi najviac študované a testované inhibítory deacetyláz histónov, ktoré majú jednak schopnosť indukovať apoptózu malígnych buniek ako aj zvyšovať ich citlivosť na klasickú cytostatickú liečbu [13].

Syntéza, spracovanie a kontrola kvality bielkovín

Okrem Warburgovho efektu bol v malígnych bunkách pozorovaný zvýšený obrat bielkovín oproti normálnym bunkám, čo otvárało možnosti liečby malígnych ochorení pomocou inhibítorov syntézy bielkovín. Cykloheximid, nešpecifický inhibítor translácie, bol však pre svoje výrazné nežiaduce účinky vyradený z medicínskej praxe. Napriek tejto negatívnej skúsenosti pokračoval výskum vývoja protinádorovej liečby na báze syntézy bielkovín ďalej. Ako jeden z cieľov bol identifikovaný mTOR systém, ktorý na translačnej úrovni reguluje syntézu bielkovín nevyhnutných pre proliferáciu a prežívanie malígnych buniek [14]. Špecifické inhibítory mTOR, temsirolimus a everolimus, sa v súčasnosti využívajú na liečbu nádorov obličiek a everolimus bol schválený aj na liečbu neuroendokrinných nádorov pankreasu a subependymálnych astrocytómov.

U mnohých typov malignít je významne deregulovaný mechanizmus evolučne konzervovanej regulácie expresie bielkovín na posttranskripčnej úrovni za účasti miRNA. Keďže zmeny v expresii miRNA významne ovplyvňujú fenotyp nádorov možnosti liečby malígnych ochorení na úrovni miRNA sú v súčasnosti predmetom tak predklinického ako aj klinického výskumu [15]. Okrem miRNA sa v súvislosti s malígnymi ochoreniami študujú aj iné typy nekódujúcich RNA [16].

K regulácii expresie bielkovín dochádza k významnej miere aj na posttranslačnej úrovni a úrovni kontroly kvality bielkovín. Dominantnú úlohu v tomto smere hrá ubiquitín-proteazomový systém (UPS), ktorý reguluje hladiny bielkovín nevyhnutných pre proliferáciu a prežívanie nádorových buniek [17]. Počas malígnej transformácie dochádza u mnohých typov nádorov v deregulácii tohto systému. Inhibítor UPS, bortezomib, sa v súčasnosti využíva na liečbu mnohopočetných myelómov a lymfómov plášťových buniek pričom v štádiu klinických skúšok je jeho použitie aj u iných typov malignít. S ohľadom na zníženie nežiaducich účinkov inhibítorov UPS sa vyvíjajú ich nové typy.

Záver

Vývoj nových diagnostických a liečebných postupov vyžaduje neustále odhaľovanie nových mechanizmov zvyhodňujúcich prežívanie malígnych buniek oproti bunkám normálnym ako aj identifikáciu nových cieľov protinádorovej liečby. V predchádzajúcej časti tejto práce sme sa zamerali najmä na metabolizmus, epigenetiku a syntézu bielkovín avšak v prípade malígnych ochorení sa intenzívne študujú aj ďalšie ciele. Ako príklady je možné spomenúť vývoj látok a liečebných postupov cielených na Ca^{2+} -závislú proteázu kalpain [18], karboanhydrázu IX [19], Notch receptory [20], bielkoviny tepelného šoku [21], TGF- β [22] a PTEN [23]. Okrem toho sú nové liečebné postupy zamerané na kombinačnú synergickú liečbu využívajúcu kombináciu už dostupných a schválených liekov, ktorej hlavným cieľom je ako zvýšenie efektivity liečby tak aj zníženie dávok použitých liečiv s predpokladom znižovania ich nežiaducich účinkov. Zvyšovanie efektivity protinádorovej liečby a znižovanie jej nežiaducich účinkov možno tiež dosiahnuť personalizáciou liečby na základe analýzy nádorového tkaniva genotypizáciou a profilovaním expresie génov umožňujúcu výber čo najoptimálnejší liečebný postup.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

1. Hlava P, Obšitníková A, Pleško I, Baráková A, Diba CS. Zhubné nádory v SR - vybrané epidemiologické ukazovatele. Národné centrum zdravotníckych informácií 2010.
2. Diba CS, Pleško I, Hlava P. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2006. Národné centrum zdravotníckych informácií 2010.
3. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:325-37.
4. Chen JQ, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826:370-84.
5. Sullivan LB, Gui DY, Heiden MGV. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16:680-693.
6. Tatarkova Z, Kuka S, Petráš M, Račay P, Lehotský J, Dobrota D, Kaplan P. Why mitochondria are excellent targets for cancer therapy. *Klin Onkol*. 2012;25:421-6.
7. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2017; 31:272-281.
8. Chen JR, Yao Y, Xu HZ, Qin ZY. Isocitrate Dehydrogenase (IDH)1/2 Mutations as Prognostic Markers in Patients With Glioblastomas. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95:e2583.
9. Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S, Zanon C, Jeuken JW, Boots-Sprenger SH, Wesseling P, Hulsebos TJ, Troost D, van Tilborg AA, Leenstra S, Vandertop WP, Bardelli A, van Noorden CJ, Bleeker FE. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro Oncol*. 2014; 16:1263-73.
10. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9:447-64.
11. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol*. 2010; 28:1069-78.
12. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, Bekele BN, Aldape KD. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2010; 12:116-121.
13. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13:673-91.
14. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12:21-35.
15. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9:775-89.
16. Lekka E, Hall J. Noncoding RNAs in disease. *FEBS Lett*. 2018 Jul 4. doi: 10.1002/1873-3468.13182.
17. Popovic D, Vucic D, Dikic I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med*. 2014; 20:1242-53.
18. Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, Martin SG. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:364-74.
19. Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. *Semin Cancer Biol*. 2015; 31:52-64.
20. Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:338-51.
21. Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, et al. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett*. 2015; 360:114-8.
22. Miyazono K, Katsuno Y, Koinuma D, Ehata S, Morikawa M. Intracellular and extracellular TGF- β signaling in cancer: some recent topics. *Front Med*. 2018 Jul 24. doi: 10.1007/s11684-018-0646-8.
23. Lee YR, Chen M, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19:547-562.

SÚČASNOSŤ A BUDÚCNOSŤ LIEČBY MALÍGNÝCH OCHORENÍ CIELENEJ NA CHARAKTERISTICKÉ ČRTY MALÍGNÝCH BUNIEK

P. Račay¹ a J. Hatok²

¹ *Biomedicínske centrum Martin, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)*

² *Ústav lekárskej biochémie, JLF UK v Martine*

Korešpondujúca osoba:

prof. RNDr. Peter Račay, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Biomedicínske centrum Martin, Divízia Neurovedy

Malá Hora 4 - 036 01 Martin – SK

E-mail: racay@jfmed.uniba.sk

Abstrakt

Malígna transformácia buniek je spojená s poruchami vnútrobunkových signálnych dráh, ktoré riadia proliferáciu a diferenciáciu buniek ako aj vnútrobunkovú a tkanivovú homeostázu. Molekulárne zmeny ktoré vedú k vývoju, prežívaniu a šíreniu malígnych buniek sú komplexné. Ich identifikácia je často krát zložitá a vyžadujúca pomerne komplikovanú analýzu malígneho tkaniva na úrovni exprese génov či na genomickej a proteomickej úrovni. Aj napriek pokrokom v diagnostických prístupoch vrátane zavedenie analýzy nádorovej DNA v krvi onkologických pacientov (liquid biopsy) je cieľená terapia malígnych ochorení stále nedostačujúca. V práci sumarizujeme možnosti cieľenej terapie malígnych ochorení a poukazujeme na vývoj nových liečiv využitím najnovších poznatkov o molekulárnych dráhach spojených s proliferáciou, prežívaním a šírením malígnych buniek.

Kľúčové slová: malígne ochorenia, cieľená terapia, bunková smrť, bunkový cyklus, signálne dráhy

Úvod

Malígna transformácia buniek ako komplexný mnohostupňový a progresívny proces vedie v dôsledku akumulácii genetických a epigenetických abnormalít k vnútrobunkovým zmenám spojených s poruchami signálnych dráh, ktoré riadia a kontrolujú proliferáciu a diferenciáciu buniek ako aj bunkovú a tkanivovú homeostázu. Proces malígnej transformácie je spojený s postupnou premenou zdravých buniek na ich malígne klon. Z hľadiska zmien na molekulovej úrovni je každý nádor tvarovaný takým špecifickým a komplexným spôsobom, že je extrémne zložitá identifikovať ktoré hlavné molekulárne zmeny vedú k jeho vývoju, prežívaniu a šíreniu [1]. Nádory ako polyklonálne útvary s výrazne heterogénnou molekulárnou architektúrou majú selekčnú výhodu v prežívaní a raste oproti normálnym bunkám. Táto polyklonalnosť ale býva zodpovedná aj za neúspešnosť liečby v dôsledku postupnej selekcie rezistentných klonov prebiehajúcou liečbou [2]. Toto je príčinou, že cieľná terapia malígnych ochorení je stále nedostatočne efektívna a to aj napriek výraznému pokroku tak v objasnení molekulových mechanizmov podmieňujúcich rast a smrť buniek ako aj súčasných možností analýzy genetických a epigenetických zmien na úrovni kompletného genómu či transkriptomických a proteomických analýz na úrovni expresie génov.

V súčasnosti známych viac ako 100 rôznych typov a podtypov malígnych ochorení špecifických orgánov sa napriek významnej variabilite malígnych buniek ako na úrovni génov tak aj na úrovni ich expresie všeobecne odlišujú od normálnych buniek v šiestich základných vlastnostiach [3]:

- sebestačnosť v rastových signáloch
- necitlivosť na inhibičné signály rastu
- vyhnutie sa programovanej smrti bunky
- neobmedzený replikačný potenciál
- udržiavaná angiogenéza
- tvorba metastáz.

Tento relatívne malý počet zmien je charakteristický pre väčšinu, ak nie pre všetky typy ľudských malígnych buniek.

V nasledujúcej časti tejto práce sa budeme venovať možnostiam cielenej liečby malígnych ochorení na základe charakteristických čŕt malígnych buniek.

Sebestačnosť v rastových signáloch

Väčšina somatických buniek v ľudskom organizme sa nachádza v stave mimo aktívneho bunkového cyklu. Prechod normálnych buniek z G0 fázy bunkového cyklu do G1 fázy s následnou proliferáciou vyžaduje rastové signály, ktoré sú generované extracelulárne pričom sú prenášané do bunky transmembránovými receptormi na povrchu buniek.

Tabuľka 1: Klinicky používané monoklonálne protilátky

Účinná látka	Cieľová molekula	Diagnóza	Výrobca
Bevacizumab	VEGF	Karcinóm hrubého čreva a rekta, nemalobunkový karcinóm pľúc	Roche
Trastuzumab	HER2	Karcinóm prsníka	Roche
Rituximab	CD20	Non-Hodgkinov lymfóm	Roche
Cetuximab	EGFR	Karcinóm hrubého čreva a rekta, skvamocelulárny karcinóm hlavy a krku	Merck
Panitumumab	EGFR	Karcinóm hrubého čreva a rekta	Amgen
Alemtuzumab	CD52	Chromická lymfoidná leukémia	Schering
Nivolumab	PD-1	Skvamózny bunkový karcinóm hlavy a krku, nemalobunkový karcinóm pľúc, metastatický melanóm, karcinóm renálnych buniek	Bristol-Myers Squibb
Pembrolizumab	PD-1	Skvamózny bunkový karcinóm hlavy a krku	MSD Corp.
Atezolizumab	PD-L1	Nemalobunkový karcinóm pľúc, uroteliálny karcinóm	

Ligandmi týchto receptorov sú rôzne typy signálnych molekúl (rastové faktory, zložky extracelulárnej matrix a molekuly zodpovedné za vzájomnú adhéziu a/alebo interakciu buniek). Maligna transformácia býva často spojená s dereguláciou receptorov rastových faktorov, najmä s ich nadprodukciou v dôsledku amplifikácie príslušného génu. Toto zvyšuje citlivosť malígnych buniek na fyziologické hladiny rastových faktorov, ktoré by za normálnych okolností nespustili proliferáciu buniek. Napríklad amplifikácia *ErbB2* génu vedie k nadprodukcii HER2 rastového receptora a následnému rozvoju karcinómu prsníka a žalúdka [4] či amplifikácia receptora pre epidermálny rastový faktor (EGFR) spojená s rozvojom glioblastómov [5]. Niektoré typy nádorov sú tiež schopné produkovať vlastné rastové faktory, ktoré ich zbavujú závislosti na rastových faktoroch produkovaných normálnymi bunkami vnútri tkaniva. Napríklad, glioblastómy produkujú rastový faktor odvodený od doštičiek (PDGF) glioblastómami [6]. V súčasnosti sa v liečbe určitých typov nádorov využívajú ako monoklonálne protilátky blokujúce receptory rastových faktorov, EGFR a HER2, (Tab. 1) tak malé molekuly, ktoré inhibujú ich kinázovú aktivitu (Tab. 2).

V dôsledku štrukturálnych zmien bielkovín s tyrozín kinázovou aktivitou podmienených mutáciami genómovej DNA môže tiež dochádzať k proliferácii signalizácii nezávislej na ligande. Vznik rôznych fúzijských bielkovín v dôsledku chromozomálnych translokácií často vedie ku konštitutívne aktívnym tyrozín kinázam (napr. BCR-ABL kináza) [7], ktoré sú terčom inhibítorov využívaných na liečbu rôznych typov malignít (Tab. 2).

Tabuľka 2: Klinicky používané inhibítory tyrozín kináz

Účinná látka	Cieľová molekula	Diagnóza	Výrobca
Imatinib	PDGFR, BCR-ABL	Gastrointestinálny stromálny karcinóm, Chromická myeloidná leukémia	Novartis
Nilotinib	BCR-ABL	Chromická myeloidná leukémia	Novartis
Sunitinib	PDGFR, VEGFR	Gastrointestinálny stromálny karcinóm, endokrinné tumory pankreasu, nádory obličiek	Pfizer
Erlotinib	EGFR	Nemalobunkový karcinóm pľúc	Roche
Gefitinib	EGFR	Nemalobunkový karcinóm pľúc	AstraZeneca
Sorafenib	RAF, PDGFR, VEGFR	Hepatocelulárny karcinóm, nádory obličiek	Bayer
Vemurafenib	BRAF	Metastatický melanóm	Roche
Trametinib	MEK	Metastatický melanóm	Novartis
Crizotinib	ALK	Nemalobunkový karcinóm pľúc	Pfizer
Ruxolitinib	JAK	Myelofibróza, pravá polycytémia	Incyte Corp/Novartis

Ďalšie mechanizmy získanej autonómie od rastových signálov sú podmienené zmenami na úrovni efektorových bielkovín príslušnej signálnej kaskády, ktoré prijímajú a prenášajú signály vysielané aktívnymi receptormi. Centrálnu úlohu medzi takýmito mechanizmami hrá RAS-RAF-MAPK kaskáda. Približne 30 % ľudských nádorov vykazuje bielkoviny RAS v konštitutívne aktívnej forme, čo vedie k prenosu mitotických signálov do buniek bez príslušnej stimulácie ich normálnych regulátorov spätnej väzby ako aj k prežitiu malígnych buniek [8]. V 40% prípadoch karcinómu hrubého čreva a rekta sa vyskytujú mutácie bielkoviny k-RAS vedúce ku konštitutívne aktívnej forme [9], čo spôsobuje rezistenciu takýchto nádorov na inhibítory EGFR. Inhibítory signálnych dráh prežitia sa minoritne využívajú v klinickej praxi (Tab. 2) avšak sú predmetom rozsiahleho základného a klinického výskumu [10].

Necitlivosť na inhibičné signály rastu

Okrem špecifických podnetov k opätovnému vstupu buniek do bunkového cyklu sa na udržiavaní buniek v G0-fáze podieľajú mnohé antiproliferatívne signály. Tieto zahŕňajú mobilné inhibítory rastu alebo inhibítory imobilizované v extracelulárnej matrix či na povrchu susedných buniek pričom aj inhibičné signály proliferácie buniek sú prenášané do bunky pomocou membránových receptorov spojených s vnútrobunkovými signálnymi okruhmi. Tiež vstupom do postmitotického stavu, ktorý je obvyčajne sprevádzaný ziskom špecifických črt spojených s diferenciáciou, strácajú normálne bunky proliferatívny potenciál. Z molekulových mechanizmov inhibujúce prechodu buniek cez G1-fázu bunkového cyklu je väčšina sprostredkovaných retinoblastomovou bielkovinou (Rb), ktorá blokuje expresiu bielkovín nevyhnutných na prechod do S fázy bunkového cyklu. Deregulovaná fosforylácia Rb ako aj jej príbuzných v malígnych bunkách vedie k aktivácii E2F transkripčných faktorov a následnej syntéze bielkovín hrajúcich úlohu v S-fáze bunkového cyklu [11]. Vývoj protinádorovej liečby je na tejto úrovni zameraný najmä na vývoj inhibítorov kináz fosforylujúcich Rb [12].

Vyhnutie sa programovej bunkovej smrti

Rôzne formy programovej bunkovej smrti predstavujú prirodzený fyziologický proces, ktorý okrem úlohy pri vývoji organizmu a tkanív, hrá významnú úlohu pri rýchlom a účinnom odstránení nepotrebných, poškodených a nebezpečných buniek vrátane nádorových. Genetický program bunkovej smrti je prítomný v latentnej forme prakticky vo všetkých bunkách. Malígna transformácia býva často krát spojená s jeho dereguláciou čo vedie nielen k prežívaniu malígnych buniek ale aj ich rezistencii na klasickú cytostatickú liečbu či cieľnú biologickú liečbu. Rezistencia nádorových buniek voči programovej smrti je sprostredkovaná prostredníctvom rôznych molekulových mechanizmov. Jedným z najčastejších mechanizmov rezistencie je deregulácia apoptózy ako hlavnej formy programovej smrti. Z molekulárnych mechanizmov sa na deregulácii apoptózy najviac podieľajú somatické mutácie génu TP53 detegované u viac ako 50% všetkých solídnych nádorov [13]. V rámci konkrétnych foriem malígnych ochorení je frekvencia mutácii TP53 vysoko variabilná. Klinicky významné mutácie TP53 vedú najmä k strate tumor supresorovej aktivity tejto bielkoviny ako kľúčového vnútrobunkového mechanizmu odpovede na poškodenie génomovej DNA. Väčšina mutácii p53 vedie k neschopnosti postihnutých buniek spustiť apoptotickú kaskádu, keďže p53 spúšťa apoptózu ako na transkripčnej tak aj na posttranslačnej úrovni [13]. Okrem mutácií p53 ďalšie mechanizmy zahŕňajú najmä nadprodukcii antiapoptotických bielkovín Bcl-2 rodiny [14], nefunkčnosť či zníženú expresiu proapoptotických bielkovín Bcl-2 rodiny [14], nadprodukcii endogénnych inhibítorov apoptózy ako aj inaktiváciu kaspáz [15]. V súčasnosti sa v klinických skúškach testuje viacero stratégií potlačenia nefunkčnosti apoptózy v malígnych bunkách [16].

Okrem apoptózy je významným mechanizmom eliminácie malígnych buniek ich usmrtenie prostredníctvom T buniek imunitného systému [17]. Tento mechanizmus je u nádorov nefunkčný kvôli expresii ligandov receptorov anti-programovej smrti (PD-L) malígnymi bunkami. Spomínané receptory a ich ligandy sú významnými cieľmi protinádorovej liečby na báze protilátok (Tab. 1).

Neobmedzený replikačný potenciál

Skrátenie telomér na kritickú hodnotu po určitom počte delení (60-70) vedie u normálnych somatických buniek k zastaveniu ich rastu a smrti buniek.

Prakticky všetky malígne bunky vykazujú zmeny, ktoré bránia skracovaniu telomér po replikácii. Z molekulových mechanizmov sa najviac uplatňuje zvýšená expresia *telomerázy*, ktorá sa zistila u viac ako 85 % nádorov [18]. Okrem toho časť nádorov udržiava teloméry prostredníctvom rekombinácie interchromozomálnych sekvencií [18]. Teloméry malígnych buniek sú teda udržiavané v dĺžkach nad kritickou hranicou, čo im zabezpečuje ich neobmedzený replikačný potenciál. Vývoj účinnej liečby cielenej na túto vlastnosť malígnych buniek je v súčasnosti zatiaľ len v štádiu základného výskumu [18].

Udržiavaná angiogenéza

Neobmedzený rast solídnych nádorov vyžaduje kontinuálny a dostatočný prísun ako energetických substrátov tak aj substrátov potrebných najmä na syntézu DNA nakoľko nevyhnutnou podmienkou delenia bunky je syntéza dvoch kópii kompletnej genómovej DNA. Nakoľko bez zvýšenej vaskularizácie

nádorov by sa jeho rast zastavil, a buď by bol organizmom eliminovaný alebo by ostal neškodne malým, musí byť dostatočné zásobenie nádorov krvou zabezpečené angiogenezou prostredníctvom zmeny rovnováhy jej induktorov a inhibítorov. V porovnaní s normálnym tkanivom vykazujú mnohé typy nádorov zvýšené hladiny rastových faktorov vyvolávajúcich angiogenezu, najmä vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru (VEGF) a/alebo fibroblastového rastového faktoru (FGF). Iné typy nádorov tiež vykazujú zníženú expresiu endogénnych inhibítorov angiogenézy ako trombospodín-1 alebo β -interferón [19] a u niektorých nádorov boli pozorované aj obe možnosti. V jadre nádorov tiež dochádza v dôsledku hypoxie k stabilizácii hypoxiou indukovateľného faktora 1 (HIF-1) a následnej transkripcii príslušných génov vrátane génu pre VEGF [20]. Monoklonálne protilátky cieleňé proti VEGF sa v súčasnosti využívajú na liečbu nádorov hrubého čreva, konečníka a prsníka (Tab 1).

Napadnutie tkanív a metastázy

U väčšiny ľudských malígnych ochorení dochádza ku klinicky obzvlášť závažnému javu ako je rozsev malígnych buniek z primárnych nádorov vedúci k ich invázii do iných tkanív a následnému vzniku nových kolónii malígnych buniek, metastáz či sekundárnych nádorov, ktoré sú príčinou 90 % všetkých úmrtí na malígne ochorenia. dochádza. Genetické zmeny a molekulárne mechanizmy spojené s inváziou malígnych buniek a tvorbou metastáz nie sú stále úplne jasné. U invazívnych či metastatických malígnych buniek dochádza najmä k zmenám bielkovín, ktoré pripájajú bunky k bielkovinám extracelulárnej matrix (integríny) alebo sú zodpovedné za interakcie medzi bunkami (napr. kadheríny) [21]. V dôsledku malígnej transformácie dochádza k zmenám najmä E-kadherínu ale aj k modifikáciám imunoglobulínov a integrínov. Nevyhnutnou podmienkou invázie nádorových buniek do iných tkanív je však deštrukcia bielkovín extracelulárnej matrix a bazálnej membrány, čo je u nádorov vyvolané proteázami patriacimi najmä do skupiny matrixových metaloproteináz [22]. Ako kadheríny [23] tak aj metaloproteinázy [22] sú intenzívne študované ako možné ciele protinádorovej liečby.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

1. Greenman C, Stephens P, Smith R, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007; 446:153-8.
2. Meyer M, Reimand J, Lan X, et al. Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:851-6.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646-74.
4. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. 2010; 25:85-101.
5. Richterová R, Jurečková J, Evinová A, a kol. Most frequent molecular and immunohistochemical markers present in selected types of brain tumors. *Gen Physiol Biophys*. 2014; 33:259-79.
6. Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, Israel MA, Giese NA. Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res*. 2002; 62:3729-35.
7. Roskoski R Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*. 2015; 100:1-23.
8. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012 May 15;72(10):2457-67.
9. Misale S, Yaeger R, Hobor S, a kol. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012; 486:532-6.

10. Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:3329-34.
11. Paternot S, Bockstaele L, Bisteau X, Kookken H, Coulonval K, Roger PP. Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase. *Cell Cycle.* 2010; 9: 689-99.
12. De Falco M, De Luca A. Cell cycle as a target of antineoplastic drugs. *Curr Pharm Des.* 2010; 16:1417-26.
13. Soussi T, Wiman KG. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ.* 2015; 22:1239-49.
14. Račay P, Jurečková J, Štefaniková A, Kliková K, Hatok J, Dobrota D. Bcl-2 family proteins in development and treatment of malignant diseases. *Acta Medica Martiniana* 2011; 11:15-25.
15. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9:501-7.
16. Kögel D, Fulda S, Mittelbronn M. Therapeutic exploitation of apoptosis and autophagy for glioblastoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2010; 10:438-49.
17. Zerdes I, Matikas A, Bergh J, Rassidakis GZ, Foukakis T. Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: biology and clinical correlations. *Oncogene.* 2018; 37:4639-4661.
18. Martínez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11:161-76.
19. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:401-10.
20. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 2010; 29:625-34.
21. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* 2010; 8:629-42.
22. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011; 278:16-27.
23. Blaschuk OW, Devemy E. Cadherins as novel targets for anti-cancer therapy. *Eur J Pharmacol.* 2009; 625:195-8.

PREHĽAD VYBRANÝCH MOLEKULÁRNYCH PROGNOTICKÝCH BIOMARKEROV GLIOBLASTOMA MULTIFORME

M. Slašťan a D. Dobrota

*Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave
(JLF UK v Martine)*

Korešpondujúca osoba:

MUDr. Michal Slašťan

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Ústav lekárskej biochémie

Malá Hora 4D - 036 01 Martin – SK

Email: michalslastan20@gmail.com

Abstrakt

Molekulárne biomarkery v posledných rokoch zmenili pohľad na klasifikovanie GBM a stali sa presnejším nástrojom odhadu prognózy ochorenia. Vysoký počet biomarkerov a absencia štandardizovaných postupov v klinickej praxi však zhoršuje dostupnosť vyšetrení v klinickej praxi a sťažuje interpretáciu výsledkov. Práca je sumárom informácií o vybraných biomarkeroch a ich väzbe k onkogenetickým procesom, progresii ochorenia a jeho prognóze.

Kľúčové slová: glioblastóm, biomarkery, prognóza

Úvod

Glioblastoma multiforme je najagresívnejším primárnym tumorom mozgu, je najčastejším malígnym nádorom mozgu a je spojený s najvyššou mortalitou [1]. Príznaky ochorenia sú spočiatku nešpecifické a rýchlo sa zhoršujú. Rizikové faktory ochorenia sú vzácne a vo väčšine prípadov ochorenia nie sú identifikované žiadne rizikové faktory. Medzi rizikové faktory patria niektoré genetické ochorenia – ako neurofibromatóza, Li-Fraumeniho syndróm a prekonaná rádioterapia. Hoci sa predpokladá, že glioblastoma multiforme vzniká z normálnych gliálnych buniek mozgu, alebo z low grade astrocytómu, novšie štúdie ukazujú, že nádor pravdepodobne vzniká z neurogénnych kmeňových buniek [2]. Diagnostika ochorenia sa opiera o zobrazovacie vyšetrenia (CT a MR) a biopsiu. V liečbe sa uplatňujú neurochirurgické postupy, chemo, rádioterapia a cielená terapia na základe molekulárnych a histologických vlastností nádoru (bevacizumab a ďalšie). Dôvodom nízkej úspešnosti chirurgickej liečby je vysoká schopnosť migrácie nádorových buniek, ktoré sú odolné voči apoptóze [3]. Úloha nádorových buniek, ktoré majú vlastnosti kmeňových buniek pri progresii a recidíve ochorenia, nie je úplne objasnená, je však zrejmé, že výskyt takýchto buniek je spojený s výrazne zhoršenou prognózou. Intenzívna pozornosť sa preto venuje vývoju terapie cielennej na túto líniu buniek. Prognózu ochorenia a odozvu na liečbu nemožno ľahko odhadnúť ani na základe histologického vyšetrenia o ktoré sa tradičná klasifikácia ochorenia opiera.

Molekulárne biomarkery

V snahe lepšie klasifikovať ochorenie možno využiť genomické a molekulárne-genetické metódy. Výsledky štúdií nie sú konzistentné, v literatúre sa na základe molekulárnych biomarkerov rozlišovali spočiatku dva subtypy – proneurálny a mezenchymálny [4]. V súčasnosti sa na základe molekulárnych biomarkerov rozlišujú až štyri subtypy – proneurálny, proliferatívny, mezenchymálny a neurálny subtyp GBM[5]. Proneurálny subtyp sa vyznačuje výraznou mierou expresie génov spojených s neurogenézou a lepšou prognózou. Oproti tomu mezenchymálny subtyp je spojený s vysokou úrovňou expresie génov pre migráciu buniek, schopnosť invázie a pluripotenciou. Pri relapse ochorenia sa mení molekulárne genetický charakter buniek z proneurálneho subtypu na mezenchymálny subtyp – proneural-mesenchymal transition, čo je spojené s agresívnejším správaním tumoru a zlou prognózou. K opačným zmenám z mezenchymálneho subtypu na proneurálny prakticky nedochádza. Mieru expresie vybraných génov možno považovať za marker prognózy ochorenia. Využitie markerov je však spojené s viacerými limitáciami. Sledovanie dynamiky ochorenia pomocou molekulárnych biomarkerov je problematické, nakoľko biopsie solídnych tumorov je obtiažne opakovať. Vzorky je obtiažne získať u pacientov, ktorí nie sú indikovaní na chirurgické riešenie, prípadne je kontraindikovaná biopsia. Molekulové markery nemusia navyše zodpovedať vlastnostiam celého tumoru, nakoľko vlastnosti buniek tumoru a molekulárne markery, ktoré bunky exprimujú sú často značne nehomogénne. Stanovenie molekulárnych biomarkerov navyše vyžaduje špecifický odber vzorky, jej skladovanie a testovacie metódy, čo výrazne komplikuje aplikáciu. Autori štúdií navyše používajú rôzne techniky, čo komplikuje posun vyšetrení do klinickej praxe. Z týchto dôvodov je klinické využitie molekulárnych biomarkerov výrazne limitované.

Epidermal growth factor receptor

Amplifikácia EGFR je častým nálezom vzoriek z GBM, v normálnom tkanive je pri tom často extrémne nízka. Amplifikácia a mutácie génov pre epidermálny growth factor receptor, spolu s chromozomálnymi aberáciami 7meho a 10teho chromozómu (7+/10-) a mutáciami v oblasti TERT promotóra sú často spojené so zlou prognózou a to napriek prognosticky menej závažnému histologickému nálezu [6]. Strata 10q je často detekovaná u GBM a je spojená s výrazne zlou prognózou a krátkym overall survival (OS) a krátkym progression free survival (PFS). Vo vývoji sú cielené terapie zamerané na inhibíciu EGFR, čo in vitro zabraňuje progresii ochorenia. Aplikácia týchto chemoterapeutík v praxi je však spojená s mnohými problémami [7].

p53 pathway

Tumor suppressorový a transkripčný faktor p53 je kľúčový pri prevencii vzniku nádorov reguláciou širokej škály bunecných odpovedí, ktoré zahŕňajú apoptózu poškodených buniek, udržiavanie stability genómu, inhibícia angiogenézy a regulácia bunecného metabolismu. TP53 patrí medzi najčastejšie gény postihnuté poruchou regulácie u rôznych druhov rakoviny. Cesta p53-ARF-MDM2 je porušená u 84% pacientov s GBM a v 94% bunecných línií GBM. Poruchy regulácie signálnej cesty p53 sú považované za viaceré vlastnosti buniek GBM, ktoré predisponujú k zlej prognóze – bunecnú invazivitu, schopnosť migrácie, vyhýbanie sa apoptóze a charakter kmeňových buniek. Zložky tejto signálnej cesty sú regulované aj pomocou rôznych mikro RNA a dlhých nekódujúcich RNA reťazcov. Mutácie TP53 majú najčastejšie charakter bodových mutácií, ktoré vedú k vysokej expresii onkogénneho variantu – gain of function (GOF) variantu p53 proteínu. Tento vedie k zvýšeniu malignity GBM pravdepodobne svojim účinkom ako transkripčný faktor na sadu génov, ktorých transkripciu za normálnych okolností neovplyvňuje [8]. Expresia takto zmeneného p53 koreluje s horšou prognózou, čo ukazuje na jeho váhu ako prognostického markera ako aj možný cieľ budúcej terapie.

Guanylate binding protein-1 (GBP1)

Guanylate binding protein-1 je úzko spojený s bunecnou proliferáciou a reguluje rast a invazívne vlastnosti glioblastómu. Zvýšená expresia génu pre GDP1 je spojené s ďalšími zmenami, najmä PETN deléciou a amplifikáciou EGFR. Zvýšená expresia GDP1 má za následok zvýšenú migráciu buniek a ich zvýšený invazívny potenciál a proliferáciu nádorového ochorenia. Miera expresie GBP1 koreluje s horšou prognózou ochorenia [9].

Isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1)

Izocitrát dehydrogenáza 1 je enzým katalyzujúci oxidatívnu dekarboxyláciu izocitrátu na 2-oxoglutarát. Vysoký výskyt mutácií génu pre IDH1 je typický pre proneurálny typ GBM. Zvýšená expresia génu vedie k abnormálnemu deleniu buniek. Mutácia v IDH1 géne je samostatným prognostickým faktorom pre dlhšie OS a PFS pacientov s primárnym i sekundárnym GBM v porovnaní s wild-type IDH1 [10].

Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)

NAMPT je enzým katalyzujúci kľúčovú reakciu regenerácie nicotinamide adenine dinucleotidu, je určujúcim enzýmom pre rýchlosť metabolickej dráhy. Nadmerná expresia génu pre NAMPT je veľmi častým javom v bunkách GBM. Nadmerná expresia vedie k vysokým hladinám NAD a k vysokej rezistencii buniek tumoru voči liečbe. NAMPT sa uplatňuje ako kľúčový faktor aj v signálnych dráhach vedúcich k onkogénnym kmeňovým bunkám – cancer-initiating cells. Nadmerná expresia NAMPT značne koreluje s EGFR pozitívnymi a IDH negatívnymi nálezmi na tumoroch, ktoré sú spájané so zlou prognózou ochorenia. V in vitro pokusoch inhibícia expresie NAMPT vedie k zvýšeniu citlivosti buniek k apoptóze a možno ho teda považovať za potenciálny cieľ terapie[11].

Marker	efekt na prognózu ochorenia	úloha v patogeneze
EGFR	amplifikácia a mutácie v géne sú spojené so zlou prognózou	zvýšená proliferácia a migrácia buniek.
p53	poruchy signálnej cesty a expresia GOF variantu sú spojené so zlou prognózou	poruchy regulácie apoptózy, strata funkcií p53 - udržiavanie stability genómu, inhibícia angiogenézy. GOF proteín je transkripčným faktorom génov, ktoré p53 za normálnych okolností neovplyvňuje
GBP1	zvýšená miera expresie koreluje s horšou prognózou ochorenia	zvýšená expresia spôsobuje zvýšenú migráciu buniek, ich výraznejší invazívny potenciál a proliferáciu ochorenia
IDH1	mutácia v géne pre IDH1 je spojená s proneurálnym typom GBM a lepšou prognózou	zvýšená expresia génu vedie k abnormálnemu deleniu buniek
NAMPT	nadmerná expresia génu pre NAMPT je spojená so zlou prognózou	zvýšená expresia génu vedie k vysokej rezistencii buniek voči chemoterapeutikám a k nadmernému výskytu cancer-initiating cells

Záver

Molekulárne biomarkery majú vzťah ku konkrétnym procesom, ktoré sa podieľajú na onkogenéze, no úplné objasnenie týchto procesov, ich postupnosť, návaznosť a úlohu konkrétnych zmien biomarkerov v procese malígnej transformácie buniek si vyžiada značné úsilie. Je však zrejmé, že analýza týchto biomarkerov umožňuje v porovnaní s klasickou histológiou lepšie klasifikovať nádorový proces a lepšie odhadnúť jeho budúce biologické správanie a prognózu. Široké klinické uplatnenie takejto analýzy zostáva však problematické pre chýbajúci konsenzus medzi vedúcimi pracoviskami, pre pomerne vysoký počet markerov, ktoré podliehajú viacerým typom zmien a potrebe použitia širšej škály metodických a technických postupov. Klinická interpretácia výsledkov stanovenia markerov je komplikovaná a vyšetrenia spravidla nemožno pre potrebu tkanivovej vzorky s odstupom času opakovať čo znemožňuje monitorovať zmeny v tkanive nádoru v priebehu terapie a pri prípadnom relapse. Napriek týmto problémom je možnosť analýzy biomarkerov výrazný prísľubom do budúcnosti, lebo umožní navrhnúť pacientovi individuálnu terapiu "na mieru".

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS (2012) statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol.* 2012;14(Suppl 5):v1-49.
- [2] Phillips HS¹, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006 Mar;9(3):157-73.
- [3] Lefranc F, Brotchi J, Kiss R (2005) Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol.* 2005;23:2411-22.

- [4] Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, et al. (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9:157–73.
- [5] Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, et al. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010; 17:98-110.
- [6] Stichel, D., Ebrahimi, A., Reuss, D. et al. *Acta Neuropathol* (2018). <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1905-0>
- [7] Shen J, Zhang T, Cheng Z, et al. (2018) Lycorine inhibits glioblastoma multiforme growth through EGFR suppression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*. 2018;37:157. doi:10.1186/s13046-018-0785-4.
- [8] Zhang Y, Dube C, Gibert M Jr., Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, Yang Y, Setiady I, Deveau C, Saoud K, Grello C, Oxford M, Yuan F, Abounader R (2018) The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers* 2018, 10, 297.
- [9] Ji Xiaoyan, Zhu Hanting, Dai Xiaoxiao, Xi Yujun, Sheng Yujing, Gao Ce, Liu Hairui, Xue Yanping, Liu Jiachi, Shi Jia, Zhang Yongsheng, Chen Yanming, Dai Xingliang, Li Ming, Wang Aidong, Dong Jun (2018) Overexpression of GBP1 predicts poor prognosis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme, *Cancer Biomarkers*, vol. Pre-press, no. Pre-press, pp. 1-16, 2018
- [10] Khan I, Waqas M, Shamim MS (2017) Prognostic significance of IDH 1 mutation in patients with glioblastoma multiforme. *J Pak Med Assoc*. 2017;67:816–817.
- [11] Lucena-Cacace A, Otero-Albiol D, Jiménez-García MP, Peinado-Serrano J, Carnero A (2017) NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis. *Oncotarget*. 2017;8(59):99514-99530. doi:10.18632/oncotarget.20577.

PREHĽAD VYBRANÝCH PROGNOTICKÝCH BIOMARKEROV ZOBRAZOVACÍCH VYŠETRENÍ U GLIOBLASTOMA MULTIFORME

M. Slašťan a D. Dobrota

*Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave
(JLF UK v Martine)*

Korešpondujúca osoba:

MUDr. Michal Slašťan

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Ústav lekárskej biochémie

Malá Hora 4D - 036 01 Martin – SK

Email: michalslastan20@gmail.com

Abstrakt

Vďaka výraznému technickému posunu sa možnosti zobrazovacích vyšetrovacích modalít výrazne rozšírili o úplne nové aplikácie, špeciálne to platí o magnetickej rezonancii, ktorej niektoré možnosti iba začínajú prenikať do klinickej praxe. S výrazným nárastom počtu zdravotníckych zariadení vybavených magnetickou rezonanciou a širším spektrom vyšetrení ktoré ponúkajú jednotlivé pracoviská sa výrazne zlepšila dostupnosť špeciálnych vyšetrení. Medzi špeciálne vyšetrenia patrí aj vyšetovanie biomarkerov glioblastoma multiforme. Práca je sumárom informácií o vybraných biomarkeroch zobrazovacích vyšetrení, ich väzbe k procesom progresie ochorenia, k prognóze ochorenia a k hodnoteniu odpovede na terapiu.

Kľúčové slová: biomarkery, zobrazovanie, prognóza, glióm

Biomarkery zobrazovacích vyšetrení

Samostatnou kategóriou prognostických faktorov GBM sú biomarkery zobrazovacích vyšetrení. Tieto sa získavajú novšími technikami magnetickej rezonancie ako sú perfúzne vážené zobrazovanie, difúzne vážené zobrazovanie a magneticko rezonančná spektroskopia, ako aj technikami pozitronovej emisnej tomografie. Samotnými biomarkermi sú relative cerebral blood volume (rCBV), apparent diffusion coefficient (ADC) a contrast transfer coefficient (K_{trans}) a zmeny metabolizmu glukózy a fenylalanínu [1]. Tieto parametre majú úzky vzťah k vaskulárnej štruktúre, k stavu hematoencefalickej bariéry a bunkovej hustoty nádoru. Biomarkery zobrazovacích vyšetrení sú objektívne, kvantitatívne parametre, ktoré možno využiť na detekciu, staging, stanovenie prognózy a posúdenie odpovede na terapiu. Stanovenie biomarkerov zobrazovacích vyšetrení je neinvazívne a možno ho opakovať. Zobrazovacie vyšetrenia zachytávajú heterogenitu nádoru.

Zobrazovanie objemu krvi v mozgu

Na zobrazovanie objemu krvi v mozgu sa používajú techniky dynamic susceptibility contrast MRI (DSC-MRI), technika zachytáva proces prvej pasáže kontrastnej látky tkanivom mozgu v krátkom časovom úseku. DSC MRI následne vypočítava viaceré parametre – cerebral blood flow (CBF), cerebral blood volume (CBV), mean transit time (MTT) a time to the peak signal change. Relative cerebral blood flow (rCBF), parameter získavaný pomocou DSC-MRI, poskytuje fyziologické informácie o neovaskularizácii a angiogenéze v mozgu in vivo. Možno ho využiť pri gradingu a hodnotení odpovede na terapiu. Viacero štúdií navrhuje využitie markera na hodnotenie odozvy na antiangiogenickú terapiu (napríklad Bevacizumab), pri výraznej korelácii úrovne markera a overall survival a progression free survival parametrov [2,3]. Stanovenie úrovne markera rCBF pred začatím terapie možno teda použiť na stanovenie prognózy a zhodnotenie pravdepodobnej odpovede na terapiu, čím možno upraviť terapeutický postup. Na hodnotenie objemu krvi v mozgu možno použiť aj metódy arterial spin labeling technique, ktorá používa pokročilé techniky magnetickej rezonancie - 3D fast spin echo (FSE) pseudocontinuous artery spin labeling (pcASL). Použitie objemu krvi v mozgu ako markera má aj svoje limitácie – získané hodnoty sú relatívne, nie absolútne čo sťažuje štandardizáciu referenčných hodnôt naprieč pracoviskami. Navyše niektoré pracoviská nepodporili využitie CBF a odvodených fyziologických parametrov ako markerov odpovede na terapiu, pre častý výskyt falošne pozitívnych a falošne negatívnych nálezov, ktoré môžu viesť k nesprávnym klinickým rozhodnutiam [4].

Zobrazovanie vaskulárnej architektúry

Fyziologické parametre získané pomocou DSC-MRI a DCE-MRI možno použiť na hodnotenie vaskulárnych štruktúr. DCE-MRI sa používa na hodnotenie hematoencefalickej bariéry. Technika vyžaduje získanie T1 vážených obrazov z DCE-MRI pred, počas a po podaní bolusu kontrastnej látky. Kontrastná látka preniká cievnou stenou a hromadí sa v mimobunkovom priestore v prípade, že je porušená hematoencefalická bariéra alebo zvýšená permeabilita steny ciev. Týmto postupom sa dajú získať nasledovné parametre – K^{trans} , objem extravaskulárneho, extracelulárneho priestoru v danom objeme tkaniva (V_e), objem krvnej plazmy v danom objeme tkaniva (V_p), a pomer medzi extravaskulárnym, extracelulárnym priestorom a objemom krvnej plazmy (K_{ep}).

K^{trans}

K^{trans} vyjadruje mieru permeability ciev, povrch steny kapilárnej siete a prietoku krvi a používa sa na hodnotenie efektu anti-angiogenickej terapie u rôznych nádorov. Viacero štúdií dokázalo vzťah medzi hladinou K^{trans} pred začatím anti-angiogenickej terapie a dĺžkou PFS a OS. V 2016 štúdia O'Neill et al. zistila, že parameter K^{trans} je efektívnejší ako FDG-PET a DW-MRI v predpovedaní odpovede GBM na anti-angiogenickú liečbu [5].

Vascular normalization index

V roku 2009 Jain et al. použili na liečbu 31 pacientov s recidívou GMB cediranib a analyzovali K^{trans} mapy pomocou DCE-MRI. Pomocou DSC-MRI bol meraný rCBV a pomocou enzýmovo viazanej immunosorbent assay bola meraná hladina kolagénu IV v periférnej krvi. Autori zistili, že zmeny v K^{trans} , rCBV a hladine kolagénu IV po dokončení jedného cyklu terapie cediranibom výrazne korelovali s OS a PFS. Autori navrhli na výpočet vaskulárneho normalizačného indexu nasledujúci vzorec:

$$VNI = -(a \times \Delta K^{trans}) + (b \times \Delta CBV) + (c \times \Delta coll IV)]$$

Štatistická analýza ukázala, že hodnoty VNI po jednom cykle terapie cediranibom boli signifikantne spojené s PFS a OS a že vyššie hodnoty VNI boli spojené s dlhším PFS a OS [6]. Normalizácia vaskularizácie podľa hypotézy vedie k zlepšeniu perfúzie tumoru, čo zvyšuje oxygenáciu a predlžuje OS u pacientov s GBM. Anti-angiogenická terapia teda pomáha len pacientom s pozorovateľnou normalizáciou vaskularizácie. Autori za dlhším OS videli niekoľko faktorov – vyššiu oxygenáciu tkaniva tumoru, lepší dosah chemoterapeutík k tkanivu tumoru, možný efekt cediranibu (inhibitor tyrozín kinázy) s indukciou programovanej bunkovej smrti a s uvedenými procesmi spojenú imunitnú odpoveď.

Arterio-venous overlap AVOL

AVOL sa meria pomocou DSC-MRI pomocou binárnych MELODIC-odvodených artériových a venózných máp. Vo vzorke tumoru je podiel arteriálneho riečiska nižší oproti normálnemu tkanivu a percentuálny podiel AVOL signifikantne vyšší oproti normálnemu tkanivu. Priemerný OS bol signifikantne vyšší u pacientov s recidívou high-grade GBM pokiaľ mali redukovaný AVOL po liečbe bevacizumabom v porovnaní s pacientmi, ktorí mali AVOL po liečbe zvýšený [7].

Zobrazovanie koeficientu difúzie

DWI je pokročilá MRI technika, ktorá využíva Brownov pohyb molekúl vody. Biologické makromolekuly zabraňujú difúzii vodných molekúl. Pomocou aplikácie silných magnetických gradientov v zobrazovacej sekvencii (napr. echo planar imaging) možno hodnotiť transverzálnu difúziu, čo umožňuje hodnotiť integritu tkaniva. Najčastejšie využívaným kvantitatívnym parametrom je ADC. ADC odráža mieru difúzie vodných molekúl a je nepriamo úmerný bunkovej hustote tkaniva. Marker sa využíva pri detekcii recidívy tumoru, monitorovaní terapeuticko-odpovede na rádio a chemoterapiu [8]. Viaceré štúdie našli koreláciu medzi úrovňou ADC a PFS, OS pacientov s novodiagnostikovaným GBM aj u pacientov s recidívou GBM [1]. Pre posúdenie dynamiky ochorenia možno použiť kombináciu funkčných difúzných máp a ADC charakteristiky. Pacienti s väčším objemom tkaniva s redukciami ADC mali kratší OS ako pacienti s menším objemom tkaniva s redukciami ADC. Rovnako rýchly nárast redukcie ADC bol spojený so skorou recidívou GBM [8].

Zobrazovanie reštrikčného spektra

ADC môže byť pozmenený signálom difúzie z edému a nekrózy, čo výrazne znižuje presnosť nameraných údajov a limituje hodnotenie. Restriction spectrum imaging (RSI) je novým typom DWI techniky, ktorý umožňuje posúdenie mikroskopickej architektúry tkaniva na základe anizotropného pohybu vodných molekúl v rôznych tkanivách. RSI je priamo úmerné bunkovej hustote nádoru. RSI je menej zaťažené falošnými nálezmi v porovnaní s ADC a je presnejšie ako ADC pri hodnotení odpovede tumoru na anti-angiogenickú terapiu u pacientov s rGBM. V 2016 štúdia Macdonald et al. posudzovala prognostickú hodnotu RSI v porovnaní s kombináciou ADC, T1 váženého postkontrastného MRI a T2 váženého FLAIR zobrazovania u pacientov liečených bevacizumabom. Autori našli koreláciu medzi nárastom RSI a poklesom ADC v oblastiach s vysokým signálom na T2 vážených FLAIR sekvenciách a horšou prognózou OS. Autori prišli k záveru, že RSI zlepšuje presnosť odhadu prognózy PFS a OS v porovnaní s štandardným DWI, T1 váženými postkontrastnými sekvenciami a T2 váženými FLAIR sekvenciami [9].

Zobrazovanie metabolizmu

Zmeny metabolizmu sú jednou z hlavných charakteristík rakoviny, zmeny sa týkajú metabolizmu glukózy, aminokyselín a lipidov v nádore. Zmeny metabolizmu možno zobrazit' dvomi spôsobmi: PET zobrazovanie pomocou značkovania rádionuklidmi (^{11}C a ^{18}F), tento postup je veľmi citlivý (10^{-11} až 10^{-12} mol/l) a pomocou spektroskopie magnetickej rezonancie, ktorá dokáže odlíšiť chemické a molekulárne zložky tumoru od zloženia okolitého tkaniva na základe vyžarovaných frekvencií, ktoré generuje spin rezonujúcich jadier (^1H , ^{31}P alebo ^{13}C).

Zobrazovanie metabolizmu glukózy

Rozdiel v metabolizme glukózy v nádorovom a zdravom tkanive bol objavený už v polovici dvadsiateho storočia. V roku 2012 bola na štúdiu recidívy high-grade GBM použitá (FDG)-PET, Colavolpe et al. zistili že pomer maximálnych hodnôt štandardizovaného uptake nádoru a normálneho tkaniva kontralaterálne priamo úmerne koreluje s OS a PFS [10] Predmetom výskumu je aj pomer ^{13}C laktátu a ^{13}C bikarbonátu.

Zobrazovanie metabolizmu aminokyselín

V nádorovom tkanive dochádza k zmenám metabolizmu glutamínu, glutamátu, methionín, aspartát a tyrozín. ^1H -MRS možno použiť na zobrazenie zmien metabolizmu cestou N-acetylaspartát ktorý vzniká z aspartátu a acetyl-CoA a ktorý je markerom poškodenia neurónov. Zmeny pomeru N-acetylaspartát/cholín pred liečbou a po liečbe predpovedajú OS pacientov. Podobne možno na odhadnutie prognózy použiť pomer cholín/creatinín [11]. Pomocou PET 3,4-dihydroxy-6- ^{18}F -fluoro-l-phenylalanine (^{18}F -FDOPA) a ^{18}F -fluoro-3-deoxy-3-L-fluorothymidine (^{18}F -FLT) možno posúdiť metabolizmus phenylalanínu, zmeny veľkosti signálnej oblasti ako aj zmeny absolútnych hodnôt možno použiť ako markery prognózy ochorenia. Zníženie objemu tumoru o 35% alebo viac dva týždne po začatí terapie (včítane anti-angiogenickej terapie) je spojené s so signifikantne dlhším PFS a OS [12].

Záver

Biomarkery zobrazovacích vyšetrení sa získavajú pomocou pokročilých postupov magnetickej rezonancie a pozitronovej emisnej tomografie, zobrazovacích modalít, ktorých dostupnosť sa rýchlo zlepšuje. Vyšetrenie a jeho vyhodnotenie si vyžaduje skúseného špecialistu. Vyšetrenie nie je invazívne a možno ho opakovať, v prípade vyšetrení magnetickej rezonanciou bez rizika spojeného s radiačnou záťažou. Mimoriadne sľubnou sa zdá byť možnosť monitorovania odpovede na terapiu a stratifikácia pacientov na responderov a nonresponderov. Napriek pomerne slušnej dostupnosti vybavenia pre vykonávanie takýchto vyšetrení v bežnej klinickej praxi ich aplikáciu sťažuje absencia štandardizovaných odporúčaných postupov.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Kong Z, Yan C, Zhu R, et al. (2018) Imaging biomarkers guided anti-angiogenic therapy for malignant gliomas. *NeuroImage : Clinical*. 2018;20:51-60. doi:10.1016/j.nicl.2018.07.001.
- [2] Sawlani R N, Raizer J, Horowitz S W, et al. (2010) Glioblastoma: a method for predicting response to antiangiogenic chemotherapy by using MR perfusion imaging— pilot study. *Radiology*. 255 (2), 622–628.
- [3] Schmainda K M, Prah M, Connelly J, et al. (2014) Dynamic-susceptibility contrast agent MRI measures of relative cerebral blood volume predict response to bevacizumab in recurrent high-grade glioma. *Neuro Oncol*. 16 (6), 880–888.

- [4] Netto J P, Schwartz D, Varallyay C, Fu R, Hamilton B, Neuwelt E A, (2016) Misleading early blood volume changes obtained using ferumoxytol-based magnetic resonance imaging perfusion in high grade glial neoplasms treated with bevacizumab. *Fluids Barriers CNS*. 13 (1), 23.
- [5] O'Neill A F, Qin L, Wen P Y, de Groot J F, Van den Abbeele A D, Yap J T, (2016) Demonstration of DCE-MRI as an early pharmacodynamic biomarker of response to VEGF Trap in glioblastoma. *J Neurooncol*. 130 (3), 495–503.
- [6] Sorensen A G, Batchelor T T, Zhang W T, et al. (2009) A "vascular normalization index" as potential mechanistic biomarker to predict survival after a single dose of cediranib in recurrent glioblastoma patients. *Cancer Res*. 69 (13), 5296–5300.
- [7] LaViolette P S, Cohen A D, Prah M A, et al. (2013) Vascular change measured with independent component analysis of dynamic susceptibility contrast MRI predicts bevacizumab response in high-grade glioma. *Neuro Oncol*. 15 (4), 442–450.
- [8] Wen Q, Jalilian L, Lupo J M, et al. (2015) Comparison of ADC metrics and their association with outcome for patients with newly diagnosed glioblastoma being treated with radiation therapy, temozolomide, erlotinib and bevacizumab. *J Neurooncol*. 121 (2), 331–339.
- [9] McDonald C R, Delfanti R L, Krishnan A P, et al. (2016) Restriction spectrum imaging predicts response to bevacizumab in patients with high-grade glioma. *Neuro Oncol*. 18 (11), 1579–1590.
- [10] Colavolpe C, Chinot O, Metellus P, et al. (2012) FDG-PET predicts survival in recurrent high-grade gliomas treated with bevacizumab and irinotecan. *Neuro Oncol*. 14 (5), 649–657.
- [11] Ratai E M, Zhang Z, Snyder B S, et al. (2013) Magnetic resonance spectroscopy as an early indicator of response to anti-angiogenic therapy in patients with recurrent glioblastoma: RTOG 0625/ACRIN 6677. *Neuro Oncol*. 15 (7), 936–944.
- [12] Schwarzenberg J, Czernin J, Cloughesy T F, et al. (2014) Treatment response evaluation using 18F-FDOPA PET in patients with recurrent malignant glioma on bevacizumab therapy. *Clin Cancer Res*. 20 (13), 3550–3559.

KONTROLA KVALITY MITOCHONDRIÍ V ONKOLÓGII

Z. Tatarková¹, A. Tomašcová¹, J. Lehotský², P. Račay² a P. Kaplán²

¹ *Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)*

² *Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine*

Korešpondujúca osoba:

doc. Ing. Zuzana Tatarková, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Ústav lekárskej biochémie

Malá Hora 4D - 036 01 Martin – SK

E-mail: tatarkova@jfmed.uniba.sk

Abstrakt

V priebehu posledných desaťročí sa podarilo odhaliť zmeny v tvare mitochondrií a ich regulátorov, ktorí sa stali hlavnými hráčmi v množstve fyziologických bunkových procesov. Mitochondrie sú extrémne dynamické organely, ktorých vysoko kontrolované morfológické zmeny odpovedajú na špecifické a rozmanité patofyziologické potreby. Preto je ich kontrola kvality rozhodujúca pre určenie funkcie a osudu buniek. Navyše, stále nové metabolické zmeny, ktoré možno pripísať mitochondriálnym (dys) funkciám, sú pevne spojené s rakovinou a jej mikroprostredím. Z tohto dôvodu sú rôzne aspekty kontroly aktivity a stavu mitochondrií v centre pozornosti onkológie. V tomto prehľadovom príspevku objasňujeme najzaujímavejšie objavy súvisiace s dvomi zjavne nezávislými, ale prísne prepojenými procesmi, ktoré sú kľúčové pre funkčnosť organel a ich ďalší osud - mitochondriálna dynamiku a mitofágiu. Navyše ich vzájomné metabolické prepojenia a regulácia môžu náhodne podporiť nádorový kontext.

Kľúčové slová: dynamika mitochondrií, kontrola kvality mitochondrií, autofágia, mitofágia

Úvod

Takmer každá bunka v ľudskom tele, od buniek bijúceho srdca až po baktérie-pohlčujúce bunky imunitného systému, je poháňaná chemickou energiou produkovanou špecializovanými vnútrobunkovými organelami - mitochondriami. Mitochondria sú základnými aktérmi v rozmanitých bunkových aktivitách, medzi ktoré patrí bunková signalizácia, tvorba a regulácia hladín reaktívnych foriem kyslíka (ROS), homeostáza hladiny vápnika v cytosole a regulácia apoptózy prostredníctvom mitochondriálneho permeability tranzitného póru [1]. Mitochondriálna dysfunkcia sa podieľa na rozvoji metabolických a neurodegeneratívnych ochorení, vrátane rakoviny a starnutia [2,3]. Proces tvorby energie so sebou prináša aj produkciu odpadových produktov, ktoré môžu byť vysoko toxické, takže ako skutočné elektrárne, mitochondrie vyžadujú prísnu kontrolu kvality a funkčnej integrity. Toto zaisťuje prežitie bunky, a tým aj samotného organizmu [4]. Nedávno vedci vyvinuli novú technológiu, ktorá analyzuje v neuveriteľnom detaile, ako bunky iniciujú odstránenie poškodených mitochondrií s využitím digitálnych snímok. Takýmto spôsobom je možné odhaliť proteínovú mapu kontroly mitochondriálnej kvality [5].

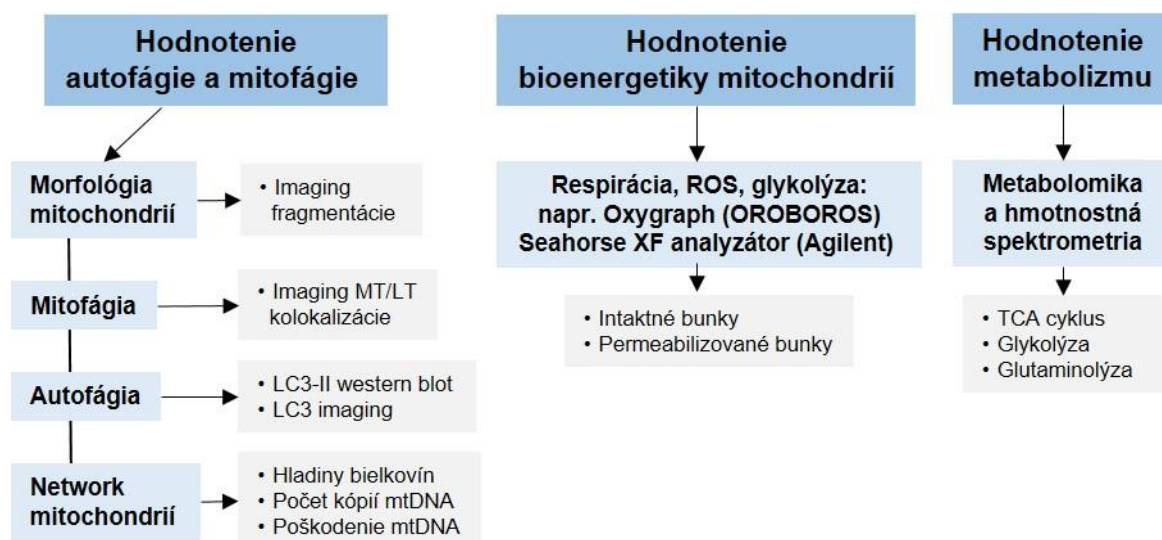
Pre správne fungovanie buniek musí existovať vzájomná komunikácia medzi mitochondriami a jadrom, ktorá sa označuje ako antegrádno-retrográdna signalizácia [6]. Jadrové gény kontrolujú mitochondriálnu biogenézu cez dosyntetizovanie mitochondrií, aby bol naplnený zvýšený metabolický dopyt. Oproti procesu biogenézy je ďalšia úroveň kontroly v jadre sprostredkovaná génmi regulujúcimi autofágiu a mitofágiu. Nedostatočná akumulácia patogénnych mutácií mitochondriálnych génov u nádorových ochorení naznačuje zapojenie aktívnych mechanizmov kontroly mitochondriálnej kvality, ktoré zabraňujú akumulácii chybných mitochondrií. Mitofágia je špecializovaný typ autofágie, ktorá selektívne degraduje a eliminuje nadbytočné alebo poškodené mitochondrie [7]. Biogenéza a mitofágia pracujú súbežne na procesoch regulácie mitochondriálnej masy, funkcie a kvality. Na druhej strane defektné mitochondrie odosielať signál priamo do procesu mitofágie prostredníctvom depolarizácie membrán, a cez kaskádu fosforylácie a ubikvitácie mitochondriálnych proteínov, zatiaľ čo znížená produkcia energie v bunke (ak je celkový počet mitochondrií nedostatočný) spúšťa biogenézu mitochondrií cez energetický senzor - AMP kinázu a iné mechanizmy.

Autofágia a kontrola kvality mitochondrií

Keďže hlavnou úlohou autofágie je kontrola kvality mitochondrií (mitoQ) a pravdepodobne aj poskytovanie substrátov pre mitochondriálny metabolizmus, pričom autofágia môže podporiť tumorigenézu a malignitu aj cez tieto mechanizmy. Avšak doposiaľ chýbajú priame dôkazy o identite špecifických substrátov získaných autofágiou-sprostredkovanou recykláciou ako i metabolické cesty, ktoré podporujú, zatiaľ nie sú známe. Nedostatočná autofágia v nádorových bunkách spôsobuje závislosť od glutamínu, čo naznačuje, že glutamín môže byť jeden zo substrátov potrebných pre autofágiu [8]. Nie je tiež známe, či autofágia eliminuje mitochondrie s patogénnymi mutáciami mitochondriálneho genómu v nádorových bunkách aby ochránila a zachovala fungujúce zásoby mitochondrií alebo či pozorované od autofágie-nezávislé defekty oxidačnej respirácie sú výsledkom poškodenia proteínov a/alebo nedostatku substrátov [9].

Systém molekulárneho "poplachu" kontroly kvality mitochondrií zahŕňa dva hlavné enzýmy: proteínovú kinázu PINK1, ktorá chemicky modifikuje proteíny s fosfátom a E3 ligázu PARKIN, ktorá označuje cieľové proteíny molekulou nazývanou ubikvitín [10]. Za normálnych podmienok majú zdravé mitochondrie na svojom vonkajšom povrchu malé množstvo PINK1. Po poškodení sa v mitochondrii nahromadí PINK1, ktorý prenáša fosfát na PARKIN, aby ho aktivoval. Následne aktivovaný PARKIN ubikvitínuje mitochondriálne proteíny, ktoré spustia proces autofágie aby zachytil, pohltil a následne odstránil tieto špecifické mitochondrie v lyzozómoch. Niektoré iné PARKIN-nezávislé mitofagické receptory zahŕňajú BNIP3 [11], NIX [12], FUNDC1 [13] a BCL2L13 [14]. Hoci PINK1-PARKIN-závislá mitofágia je najlepšie charakterizovaná a väčšinou spájaná s nádormi, nedávno boli popísané ďalšie alternatívne dráhy, pričom senzitivity individuálnych typov buniek sa ukazuje významným faktorom determinujúcim spustenie typickej dráhy mitofágie. Hoci je logické špekulovať o úlohe mitofágie u rakoviny, avšak stále chýba priamy dôkaz o zapojení mitofágie do tumorigenézy. Navyše úloha

kontroly kvality mitochondrií pri rakovine väčšinou zahŕňa informácie získané pomocou genetických modelov a s manipuláciou dobre overených autofagických génov [15].



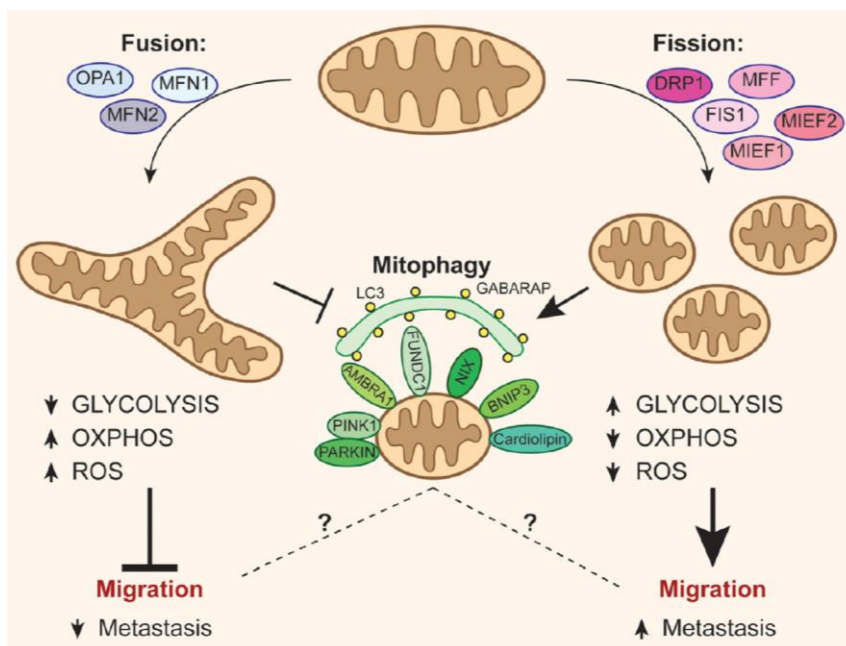
Obrázok 1: Metódy hodnotenia mechanizmov kontroly kvality mitochondrií (upravené podľa [16])
ROS-reaktívne formy kyslíka, MT- MitoTracker, LT- LysoTracker

Veľkou výzvou súčasnosti je snaha o zavedenie workflow konceptu monitorujúceho čo najkomplexnejší obraz zahŕňajúci detekciu procesov autofágie a mitofágie, bioenergetiku a kontrolu kvality mitochondrií. Väčšina štúdií sa zameriava na sledovanie individuálnych procesov, avšak zatiaľ nebol navrhnutý integrovaný metodologický prístup, ktorý by poskytol komplexný pohľad na bunkové a tkanivovo špecifické reakcie na fyziologické, farmakologické a patologické poruchy. Toto je dôležité, nakoľko hodnotenie kvality mitochondrií si vyžaduje štandardizované protokoly, ktoré by umožnili testovanie kľúčových prvkov tohto zložitého procesu pomocou širokého spektra biologických údajov. Nedávno bola publikovaná ucelená komplexná stratégia (Obr. 1), ktorá spája hodnotenie autofágie s poškodením mitochondrií, mitochondriálnou dynamikou a funkciou ako aj bunkovým metabolizmom s využitím bunkových kultúr [16]. Funkcia mitochondrií môže byť takto testovaná v reálnom čase, aby bolo možné posúdiť dôsledky expozície toxínom či farmakologickým agensom. Je vysoký predpoklad, že tento prístup bude významný pre výskumníkov v širokej oblasti biomedicínskeho výskumu.

Dynamika mitochondrií a tvorba metastáz

Dynamika mitochondrií je regulovaná na úrovni dvoch hlavných procesov – fúzie a štiepenia (Obr. 2). Štiepenie je sprostredkovaná rodinou dynamin-related proteínov (Drp). Aktivovaný Drp1 sa translokuje z cytosolu do mitochondriálnej membrány kde interaguje s Drp1 receptormi (Mid 49, Mid51, Mff) a Fis1 aby vytvoril štiepny komplex. Drp1 oligoméry zužujú a následne delia mitochondrie [17]. Proces fúzie je sprostredkovaný prostredníctvom mitofusínov (Mfn1/2) a Opa1. Mitofusíny pôsobia na vonkajšej membráne mitochondrií, zatiaľ čo Opa1 sa predpokladá jeho pôsobenie na vnútornej membráne mitochondrií. Mitofusíny navzájom interagujú a vytvárajú hemifúziu stopku, ktorá postupne rastie do lipidového otvoru a nakoniec obnoví integritu membrány. Opa1 vďaka svojej kardiolipín-viažúcej doméne formuje fúzny pór vo vnútornej mitochondriálnej membráne [18,19].

Aktivácia Opa1-MFN1/2-sprostredkovanej mitochondriálnej fúzie spúšťa oxidačnú fosforyláciu na úkor anaeróbnej glykolýzy, čo vedie k zvýšeniu hladín ROS a následne k zhoršeniu migrácie rakovinových buniek.



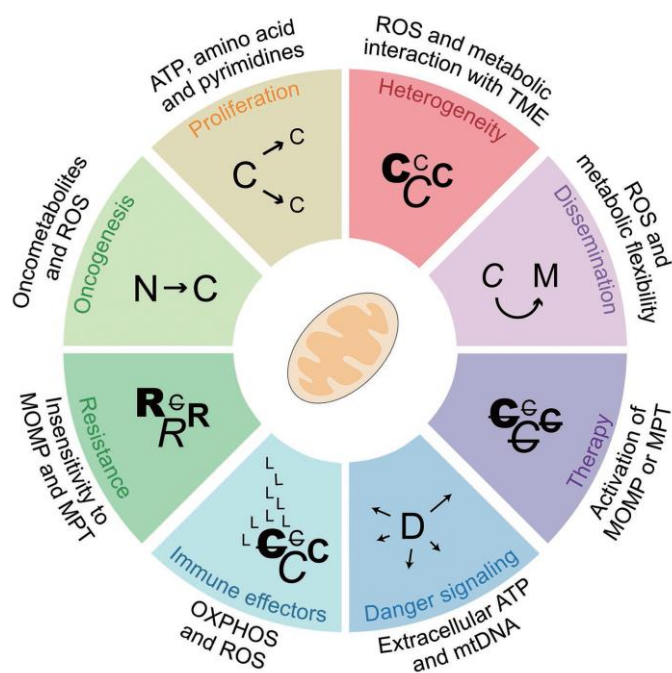
Obrázok 2: Dynamika mitochondrií a tvorba metastáz [17]

Na druhej strane Drp1-závislé štiepne procesy inhibujú oxidačný metabolizmus zvýšením energetického výťažku glykolýzy a znižujú produkciu ROS, čím sa uľahčuje tvorba metastáz. Navyše, štiepenie je rozhodujúcim procesom pre správnu aktiváciu mitofágie, hoci zostáva stále nejednoznačné, ako môže byť mitofágia spojená s migráciou nádoru.

Nedávne publikácie identifikovali lineárny vzťah medzi osudom mitochondrií a rakovinou [20-23]. V skutočnosti mitochondrie môžu byť spojené s tvorbou a progresiou rakoviny, pričom ich príspevok má silný vplyv na invazívnosť a metastatický profil rakoviny [21]. Rastúci počet dôkazov naznačuje, že mnohé nádorové bunkové línie a solídne nádory podliehajú drastickému metabolickému reprogramovaniu; obmedzujú Krebsov cyklus a oxidačnú fosforyláciu ako dôsledok mutácií, ktoré ovplyvňujú aktivitu kľúčových enzýmov týchto procesov [20]. Avšak spojenie medzi dysfunkciou mitochondrií a rakovinou nie je zviazané iba s metabolizmom. V skutočnosti činnosť mitochondrií môže priamo či nepriamo ovplyvniť expresiu nDNA alebo mtDNA, mutácie [22], epigenetické zmeny ako je metylácia [20], migrácia a smrť buniek [23],

Metabolizmus mitochondrií a onkogenéza

Ako už bolo spomínané, mitochondrie majú veľký vplyv na prakticky všetky procesy spojené s onkogenézou, zahŕňajúc malígnu transformáciu, progresiu nádoru, odpoveď na liečbu a protirakovinové imunologické odpovede [24]. Mitochondrie pritiahli značnú pozornosť ako ciele pre vývoj nových protirakovinových látok, a to nielen preto, že zohrávajú ústrednú úlohu v rezistencii malígnych buniek na indukciu RCD (regulovanej bunkovej smrti) liečby, ale aj preto, že podliehajú ich fenotypovej a metabolickej plasticite (Obr. 3). Prípad venetoklaxu, molekuly, ktorá spúšťa RCD napodobením aktivity proapoptotických členov rodiny BCL2 proteínov, dobre ilustruje vysoký potenciál agensov zameraných na mitochondriu v liečbe špecifických malignít [25].



Obrázok 3: Mitochondria a proces onkogenézy [24]

C-nádorová bunka, D-neprežívajúce nádorové bunky, L-lymfocyt, M-metastázujúce nádorové bunky, N-normálne bunky, R- rezistentné nádorové bunky, TME-mikroprostredie nádoru

Avšak nešpecifické zameranie na mitochondriálne funkcie v mikroprostredí nádorov môže mať významné a zároveň aj závažné práve neopodstatnené účinky. Napríklad inhibícia protinádorovej imunitnej odpovede, čo je situácia, ktorá pripomína použitie farmakologických inhibítorov autofágie [26]. Preto sa v najbližšej budúcnosti budú musieť navrhnúť rafinované stratégie, ktoré umožnia špecifickú moduláciu mitochondriálnych funkcií vo vybraných bunkových populáciách, aby terapeutický potenciál agensov zameraných na mitochondriu bolo možné plne využiť v klinickej praxi. Avšak, veľký počet predklinických a klinických prác je stále potrebný na to, aby sa tento ambiciózny cieľ stal realitou v klinickej praxi.

Záver

Napriek značnému pokroku, pochopenie úlohy mitochondriálnej dynamiky a mitofágie pri kontrole pôvodu a progresie nádoru zostáva veľa kľúčových otázok nevyriešených. Navyše situáciu komplikuje vzájomná interakcia spomínaných procesov. V súčasnosti je na PubMede dostupných približne 4407 odborných prác diskutujúcich rôzne aspekty autofágie a mitochondrií. Z týchto, 1438 prác sa zaoberá bioenergetikou mitochondrií, zatiaľ čo 478 diskutuje o kontrole kvality mitochondrií. Avšak iba niekoľko dôkazov naznačuje, že je úplne nerozumné urobiť všeobecné vyhlásenie o tom, ako môže autofagia a mitofágia ovplyvniť nádor. Podobne, na základe objavujúcich sa zistení, sa zdá, že regulácia tvaru mitochondrií hrá rozhodujúcu úlohu v prvých krokoch tvorby nádoru a schopnosti migrácie/invázie rakoviny. Navyše zostáva objasniť aj to, ako rôzne aspekty mitochondriálneho metabolizmu a dynamiky môžu ovplyvniť protinádorovú imunitnú odpoveď a aké sú ich relatívne prínosy k progresii nádoru alebo klírensu. Tento nový koncept pomáha rozšíriť naše vedomosti a perspektívy v oblasti liečby nádorov, čo umožňuje identifikovať nové kandidátske ciele na liečbu. V neposlednom rade treba spomenúť individuálny prístup k jednotlivým pacientom vzhľadom na známy klinicko-molekulárno-biochemický profil.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Wallace DC, Fan W, Procaccio V (2010) Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* 5: 297-348.
- [2] Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. (2018) Novel Insights Into the Anti-aging Role of Mitophagy. *Int Rev Cell Mol Biol* 340:169-208.
- [3] Suliman HB, Piantadosi CA (2016) Mitochondrial Quality Control as a Therapeutic Target. *Pharmacol Rev* 68(1): 20-48.
- [4] Ashrafi G and Schwarz TL (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* 20: 31-42.
- [5] Harvard Medical School (2018) 'Digital snapshots' reveal the protein landscape of mitochondrial quality control: Researchers develop new technology to analyze in unprecedented detail how cells initiate removal of damaged mitochondria. www.sciencedaily.com/releases/2018/05/180503142623.htm
- [6] Chandel NS. (2015) Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles. *Cell Metab* 22: 204–206.
- [7] Randow F, Youle RJ. (2014) Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria. *Cell Host Microbe* 15: 403–411.
- [8] Strohecker AM, Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Price SM, et al. (2013) Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer discovery* 3: 1272–1285.
- [9] Pickrell AM, Huang CH, Kennedy SR, Ordureau A, et al. (2015) Endogenous Parkin Preserves Dopaminergic Substantia Nigral Neurons following Mitochondrial DNA Mutagenic Stress. *Neuron* 87: 371–381.
- [10] Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, et al. (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524: 309–314.
- [11] Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, et al. (2004) Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* 64: 4286–4293.
- [12] Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, et al. (2007) NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Nat Acad Sci USA* 104:19500–19505
- [13] Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, et al. (2012) Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 14: 177–185.
- [14] Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, et al. (2015) Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat Comm* 6: 7527.
- [15] Zong WX, Rabinowitz JD, White E. (2016) Mitochondria and Cancer. *Mol Cell* 61(5): 667-676
- [16] Redmann M, Benavides GA, Wani WY, Berryhill TF, et al. (2018) Methods for assessing mitochondrial quality control mechanisms and cellular consequences in cell culture. *Redox Biol* 17: 59-69.
- [17] Bordi M, Nazio F, Campello S. (2017) The Close Interconnection between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Cancer. *Front Oncol* 2; 7:81.
- [18] Chan DC. (2012) Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 46: 265–87.
- [19] van der Bliek A, Shen Q, Kawajiri S. (2013) Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:1–16.
- [20] Sciacovelli M, Gonçalves E, Johnson TI, Zecchini VR, et al. (2016) Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature* 537(7621): 544–7.
- [21] Vyas S, Zaganjori E, Haigis MC. (2016) Mitochondria and cancer. *Cell* 166: 555–66.
- [22] van Gisbergen MW, Voets AM, Starmans MH, de Coo IF, et al. (2015) How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. *Mutat Res Rev Mutat Res* 764:16–30.
- [23] Gaude E, Frezza C. 2014) Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab* 2:10.
- [24] Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMB, Kroemer G, Galluzzi L. (2018) Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res* 28(3): 265-280.
- [25] Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. (2017) From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 16: 273-284.
- [26] Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Demaria S, Formenti SC, Kroemer G. (2017) Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 14: 247-258.

POROVNANIE DOSTUPNÝCH METÓD NA ODSTRÁNENIE ALBUMÍNU ZO VZORIEK KRVNÉHO SÉRA

A. Tomašcová¹, Z. Tatarková¹, D. Kalenská¹ a J. Lehotský^{1,2}

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)

²Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine

Korešpondujúca osoba:

Mgr. Anna Tomašcová

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Ústav lekárskej biochémie

Malá Hora 4D - 036 01 Martin – SK

E-mail: benova111@uniba.sk

Abstrakt

Krv je tekutina obmývajúca všetky telesné orgány a nesie so sebou molekuly z rôznych tkanív. Preto je dôležitým a navyše aj ľahko dostupným biologickým materiálom v klinickej diagnostike. Pri objavovaní nových proteínových biomarkerov v krvnom sére pre rôzne ochorenia ale čelíme problému v podobe prítomnosti vysoko abundančných proteínov (VAP), najmä albumínu. Biomarkery sa zvyčajne v krvi nachádzajú v nízkych koncentráciách a VAP ich pokrývajú a interferujú s ich signálom. V súčasnosti existuje niekoľko bežne používaných techník na odstránenie albumínu aj ďalších VAP z krvného séra od imunoafinitných kolón, cez komerčné kity až po metódy založené na rozličnej rozpustnosti jednotlivých proteínov v organických rozpúšťadlách.

Cieľom predkladanej práce bolo porovnať dva prístupy odstránenia albumínu, tzv. dealbuminizácie, zo vzoriek ľudského séra, ktoré sú kompatibilné s metódou dvojdimenzionálnej elektroforézy a identifikácie proteínov hmotnostnou spektrometriou. Prvou testovanou metódou bol komerčný kit ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion kit, ktorý je finančne náročnejší a dovoľuje spracovať iba určité množstvo vzorky. Druhým prístupom bola finančne nenáročná dealbuminizácia zrážaním proteínov acetonitrilom a metanolom (AMV protokol). Podľa našich výsledkov je efektívnejšia metóda dealbuminizácie AMV protokolom, ktorý signifikantne zvýšil počet proteínových spotov a zlepšil identifikáciu proteínov na hmotnostnom spektrometri.

Kľúčové slová: albumín, biomarker, krvné serum, dvojdimenzionálna elektroforéza

Úvod

Krvné vzorky sa rutinné využívajú v klinickej praxi na široké spektrum diagnostických účelov. Proteíny v krvnom obehú odrážajú zdravotný stav pacienta. Zmeny v koncentrácii a prípadné posttranslačné modifikácie proteínov reprezentujú určité ochorenie a môžu slúžiť ako potenciálne diagnostické biomarkery. Navyše, krv je ľahko dostupný biologický materiál s možnosťou opakovaného odberu, čo umožňuje dlhodobé sledovanie stavu [1].

Na hľadanie nových biomarkerov sa používa necielená „shotgun“ proteomika a zmeny v expresii proteínov korelujúce so študovanou chorobou sa vyjadrujú relatívnou kvantifikačnou metódou [2]. Jednou z tradičných metód „shotgun“ proteomiky je aj dvojdimenzionálna elektroforéza (2-DE) spojená s identifikáciou proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie. Tento postup bol úspešne použitý napríklad pri štúdiách krvných biomarkerov cervikálneho, hepatocelulárneho alebo kolorektálneho karcinómu [3; 4; 5].

Avšak hľadanie nových biomarkerov čelí problému v podobe vysoko abundantných proteínov (VAP), ktoré tvoria až 95 % z celkového objemu proteínov v krvi [6]. VAP produkujú výrazné signály, ktoré prekrývajú a interferujú s detekciou biomarkerov, ktoré sa zväčša vyskytujú v nízkych koncentráciách [7]. Najvýraznejším VAP je albumín, ktorý tvorí 50 % celkovej proteínovej hmoty a proteínové biomarkery bývajú v koncentrácii o desiatky rádov nižšej (>10 ng/ml). Albumín je navyše známy transportér fyziologicky významných proteínov a peptidov, takže je dôležité mať na pamäti, že odstránenie albumínu zo vzorky môže spôsobiť stratu potenciálnych biomarkerov [8].

Odstránenie albumínu a ďalších VAP z krvnej plazmy alebo séra je nevyhnutným krokom pred analýzou vzorky proteomickými metódami. Medzi najviac používané prístupy patrí imunoafinitná proteomická separácia, odstredivá ultrafiltrácia, komerčné kity založené na farbe Cibacron blue a precipitácia oranickými rozpúšťadlami [19; 10; 11]. Imunoafinitné zariadenia sú založené na interakcii antigén-protilátka a sú veľmi špecifické, no majú relatívne nízku kapacitu. Navyše sú veľmi drahé a vyžadujú spojenie so špecifickými prístrojmi ako je vysokovýkonná kvapalinová chromatografia [12].

V tejto práci sme porovnali dve metódy odstránenia albumínu zo vzorky ľudského séra - komerčný kit ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion Kit (Sigma-Aldrich) založený na väzbe albumínu na Cibacron Blue farbu a zrážanie proteínov pomocou organických rozpúšťadiel acetonitrilu (ACN) a metanolu. Účinnosť týchto metód bola porovnaná na základe proteomických profilov vytvorených 2-DE a náhodne vybrané proteíny boli identifikované pomocou MALDI (matricou asistovaná laserová desorpcia/ionizácia) hmotnostnej spektrometrie. Naším cieľom bolo zistiť, či protokol na odstránenie albumínu založený na bežne dostupných a finančne nenáročných organických rozpúšťadlách je porovnateľne účinný s komerčným kitom a môže byť použitý na gélové proteomické metódy.

Materiál a metódy

Vzorky

Na štúdiu sme použili kontrolné vzorky zdravých jedincov ($n=4$) zo štúdie „Molekulárne štúdium vybraných porúch CNS“, ktorá bola schválená Etickou komisiou JLF v Martine, UK v Bratislave, kód certifikácie IRB00005636. Krv kontrolných jedincov sa získala v rámci dobrovoľného darcovského odberu na Národnej transfúznej stanici Martin. Venózna periférna krv sa odobrala do skúmaviek Vacutest® s gélovým aktivátorom krvného zrážania o objeme 5 ml na získanie krvného séra. Skúmavky sme scentrifugovali (4°C , 7000 rpm, 5 min) a sérum uskladnili na -80°C .

Odstránenie albumínu pomocou ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion Kit

ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion Kit (Sigma-Aldrich) sme použili presne podľa odporúčaného manuálu (súčasť kitu) s nanáškou 50 μl séra. Dealbuminované vzorky (ProteoPrep kit sérum) sme hlboko zamrazili na -80°C .

Odstránenie albumínu s acetonitril-metanol-voda (AMV) protokolom

Pri tejto metóde sme postupovali podľa mierne upraveného protokolu publikovaného v práci Tuchskej et al. [13]. 25 μl krvného séra sme zmiešali s 125 μl 100% ACN a nechali inkubovať 15 min na ľade.

Centrifugáciou (13 000 rpm, 15 min) sme oddelili pelet od supernatantu. Pelet sme následne rozsuspendovali v 50 µl roztoku AMV (12,5 µl 100% ACN, 12,5 µl 100% metanolu, 50 µl deionizovanej vody) a znova inkubovali 15 min na ľade. Centrifugáciou (13 000 rpm, 15 min) sme získali pelet proteínov, ktorý sme nechali vysušiť na vzduchu pri izbovej teplote a rozpustili v 1% kyselina mravčej (rozpúšťanie na trepačke, 20°C, 750 rpm, 2 h). Vzorky (AMV protokol sérum) sme uskladnili na -80°C.

Meranie koncentrácie proteínov

U vzoriek séra sme stanovili koncentráciu proteínov pomocou komerčného kitu DCTM Protein Assay (Bio-Rad) podľa manuálu výrobcu.

Dvojdimenziálna gélová elektroforéza

Nanášku s 200 µg proteínov sme vyzrážali ľadovým acetónom a pelet proteínov získali centrifugáciou (13 000 rpm, 10 min). Pelet sme rozpustili v rehydratačnom tlmivom roztoku (Rehydration/Sample buffer, Bio-Rad), rehydratovali na 7 cm stripoch (ReadyStrip IPG, Bio-Rad) s lineárnym imobilizovaným pH 3-10 gradientom. Izoelektrická fokusácia (IEF) prebehla v prístroji Protean IEF system (Bio-Rad) v trojkrokovom protokole (250 V na 20 min, 4000 V na 2 h a 4000 V pokiaľ celkové napätie nedosiahlo 10,000 Vh). Pred separáciou v druhej dimenzii sme stripy ekvilibrovali 15 min v ekvilibračnom tlmivom roztoku I (Equilibration Buffer I, Bio-Rad) a 15 min v ekvilibračnom tlmivom roztoku II (Equilibration buffer II, Bio-Rad) s prídavkom 0,03 g/ml jodoacetamidu. Druhá dimenzia prebehla v 12% polyakrylamidovom géle pri konštantnom elektrickom prúde 15 mA/gél. Gély sme ofarbili Bio-safe Coomassie G-250 farbou (Bio-Rad), zosnímali pomocou denzitometru GS-800 (Bio-Rad) a analyzovali v programe PDQuest 8 software (Bio-Rad).

Identifikácia proteínov hmotnostnou spektrometriou

Vybrané proteínové spoty sme vyrezali z gélu, Coomassie farbu sme odstránili premývaním s 50% ACN a spoty dehydratovali v 100% ACN. Nasledovala inkubácia s 10 mM ditiotreitolom (56°C, 45 min) a potom s 55 mM jodoacetamidom (izbová teplota, 30 min, tma). Nakoniec sa spoty dvakrát premyli v 25 mM bikarbonáte amónnom a 100% ACN. Na digestiu proteínov sme použili 3 µl trypsínového roztoku/spot (20 ng/µl) (Promega) s inkubáciou cez noc na trepačke (37°C, 1000 rpm). Peptidy boli extrahované 10% kyselinou trifluoroctovou a zakoncentrované vo vákuovom vysokorychlostnom koncentrátore (Vacufuge plus vacuum Concentrator, Eppendorf) na objem približne 10 µl. Proteíny sme naniesli na MALDI terčik (AnchorChip target, Bruker Daltonics) s matricou (kyselina α-kyano-4-hydroxyškoricová, 1 mg/ml) a analyzovali s pomocou UltrafleXtreme MALDI-TOF (MALDI – analyzátor doby letu) hmotnostného spektrometra (Bruker Daltonics). Získané hmotnostné spektrá peptidov sme porovnali s databázou SwissProt s použitím MASCOT vyhľadávacieho programu (Matrix Science).

Výsledky

Koncentrácia proteínov

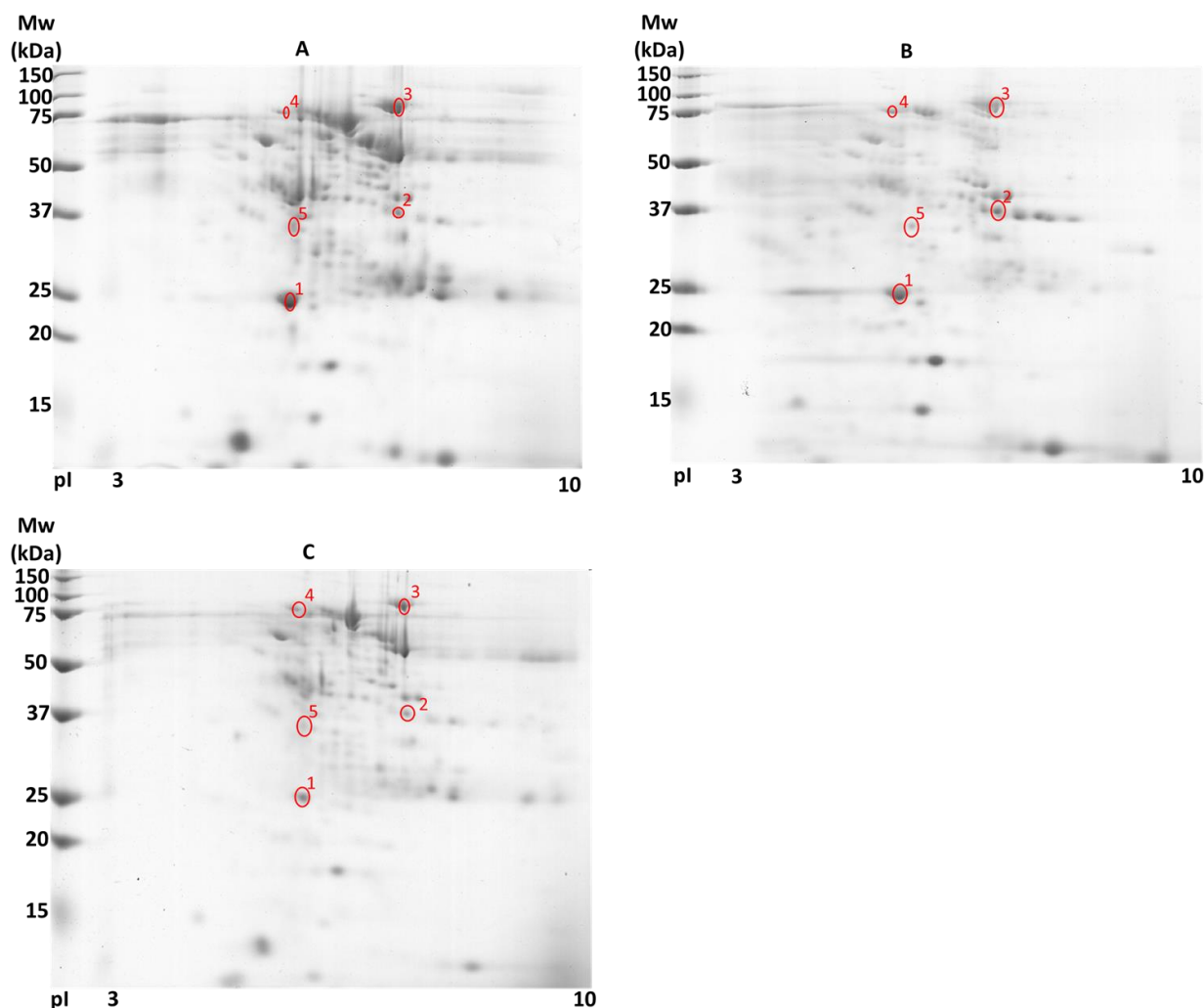
Koncentrácia proteínov v krvnom sére bola $72,5 \pm 8,7$ mg/ml. Po použití ProteoPrep kitu aj AMV protokolu sa koncentrácia proteínov vo vzorke znížila približne na jednu tretinu pôvodnej koncentrácie. Nameraná koncentrácia v sére po odstránení albumínu je zhrnutá v Tab. 1.

Tabuľka 1: Koncentrácia proteínov v sére po dealbuminizácii.

Metóda	ProteoPrep kit		AMV protokol sérum (mg/ml ±SD)
	Frakcia	sérum (mg/ml ±SD)	
Prečistená frakcia		22,4 ± 1.7	21,1 ± 3,2

Dvojdimenziálna elektroforéza

Krvné sérum sme pred aj po dealbuminizáciou analyzovali metódou 2-DE. V sére sme zdetegovali 134 ± 5 proteínových spotov (Obr. 1A). Po prečistení kitom ProteoPrep sme zdetegovali na proteínovej mape 153 ± 4 spotov (Obr. 1B) a po dealbuminizácii AMV protokolom 168 ± 6 spotov (Obr. 1C). Pomocou dealbuminizácie boli z proteínovej mapy odstránené proteínové zhľuky nachádzajúce v regióne s vysokým výskytom albumínu (rozmedzie 50 – 75 kDa a pH 5–7).



Obrázok 1: Reprezentatívne 2-DE mapy porovnávajúce dealbuminizáciu ProteoPrep kitom a AMV protokolom: A – sérum, B – ProteoPrep kit sérum, C – AMV protokol sérum. Zobrazené sú reprezentatívne gély zo štyroch nezávislých experimentov a predstavujú rovnakú vzorku séra po rozličných dealbuminizačných zásahoch. Čísla spotov sa zhodujú s číslami v Tab. 2.

Na 2-DE mapách sme náhodne vybrali 5 proteínových spotov na rovnakých miestach pre každú skupinu – neupravené sérum, ProteoPrep kit sérum a AMV protokol sérum. Proteíny sme identifikovali MALDI-TOF hmotnostnou spektrometriou. Identifikované proteíny sú zhrnuté v Tab. 2. Úspešnosť proteínovej identifikácie je určená pomocou Mascot (MS) skóre, ktoré posudzuje signifikanciu výsledku. Vo všeobecnosti, MS skóre väčšie ako 67 sa nachádza v hladine významnosti ($p < 0.05$) [14].

Identifikované proteíny v spotoch 1 a 2 boli rovnaké pre všetky tri skupiny a to apolipoproteín A1 (APOA1_HUMAN) v 1 a zmes transferínu (TRFE_HUMAN) a albumínu (ALBU_HUMAN) v 2. V spote 3 sme v neupravenom sére a ProteoPrep kit sére identifikovali TRFE_HUMAN v zmesi s ALBU_HUMAN, no v AMV protokol sére sme identifikovali iba TRFE_HUMAN s vysokým MS skóre. Alfa-1B-glykoproteín (A1BG_HUMAN) bol identifikovaný ako spot 4 v sére prečistenom AMV protokolom s dostatočne vysokým MS skóre a taktiež v neupravenom sére, no s nedostatočnou signifikanciou. V 2-DE mape séra prečisteného ProteoPrep kitom sa nám nepodarilo spot 4 identifikovať. Ďalej sa nám nepodarilo stanoviť

proteín v spote 5 v neupravenom sére. V prípade ProteoPrep kit séra bol v spote 5 identifikovaný albumín, pričom ale nesedí jeho molekulová veľkosť (71,32 kDa) s polohou na 2-DE mape (okolo 40 kDa). Po prečistení AMV protokolom sme v spote 5 identifikovali vitamín D viažuci proteín (VTDB_HUMAN) s dostatočným MS skóre.

Tabuľka 2: Identifikované proteíny z proteínových máp. Číslo spotu sa zhoduje s číslom na Obr. 1. UniProt ID - UniProt identifikátor, Mw – relatívna molekulová hmotnosť, pI – izoelektrický bod

	Sérum - bez prečistenia				ProteoPrep Kit sérum				AMV protokol sérum			
Spot	UniProt ID	Mw (kDa)	pI	MS skóre	UniProt ID	Mw (kDa)	pI	MS skóre	UniProt ID	Mw (kDa)	pI	MS skóre
1	APOA1_HUMAN	30,76	5,56	274	APOA1_HUMAN	30,76	5,56	177	APOA1_HUMAN	30,76	5,56	247
2	Zmes TRFE_HUMAN ALBU_HUMAN	79,29 71,32	6,81 5,92	231 57	Zmes TRFE_HUMAN ALBU_HUMAN	79,29 71,32	6,81 5,92	357 118	Zmes TRFE_HUMAN ALBU_HUMAN	79,29 71,32	6,81 5,92	82 49
3	Zmes TRFE_HUMAN ALBU_HUMAN	79,29 71,32	6,81 5,92	327 110	Zmes TRFE_HUMAN ALBU_HUMAN	79,29 71,32	6,81 5,92	277 98	TRFE_HUMAN	79,29	6,81	369
4	A1BG_HUMAN	54,79	5,56	59	-	-	-	-	A1BG_HUMAN	54,79	5,56	125
5	-	-	-	-	ALBU_HUMAN	71,32	5,92	109	VTDB_HUMAN	54,53	5,4	71

Diskusia

Použitie séra na 2-DE vedie k presýteniu proteínovej mapy albumínom a inými VAP, čo znižuje schopnosť rozlíšenia jednotlivých proteínových spotov a ich prekryv zhlukmi VAP. Preto je odstránenie albumínu a prípadne ďalších VAP dôležitým krokom v proteomickom skúmaní krvného séra [15]. V predkladanej práci sme testovali dve rôzne metódy odstránenia albumínu, ktoré sme vybrali pre ich kompatibilitu s 2-DE a jednoduchú prípravu. Taktiež bolo našim cieľom porovnať, či finančne nenáročná AMV metóda prečisťovania proteínov organickými rozpúšťadlami dokáže konkurovať komerčnému kitu. Testovaný komerčný ProteoPrep Blue Albumin and IgG depletion Kit bol úspešne použitý pri skúmaní biomarkerov u nádoru vaječníkov [16]. Tento kit je založený na stacionárnej fáze tvorenej Cibacron farbou, ktorá slúži ako polycyklický aniónový ligand viažuci albumín [17].

Obidve metódy zvýšili počet proteínových spotov na 2-DE mape a odstránili albumínové zhluky koncentrované v oblasti 50 – 75 kDa. Keď porovnáme výsledky z identifikácie proteínových spotov neupraveného séra a po prečistení AMV protokolom, môžeme povedať, že sa nám podarilo odstrániť albumín zo spotu 3, zvýšiť skóre na úroveň signifikantnosti u A1BG_HUMAN a identifikovať proteín VTDB_HUMAN v spote 5. Naopak, pri použití ProteoPrep kitu sme identifikovali albumín aj v spote 5 a spot 4 sa nám nepodarilo identifikovať vôbec.

Inkubácia séra s ACN v objeme aspoň 20 % narušuje väzbu proteínov s albumínom, a tým znižuje pravdepodobnosť straty potenciálne dôležitých proteínov [12; 8]. Taktiež bolo dokázané, že pri zrážaní metanolom zostane značná časť albumínu v supernatante [13]. Navyše, organické rozpúšťadlá odstraňujú nepolárne kontaminanty ako lipidy ktoré interferujú s IEF [18].

Záver

Podľa našich výsledkov dokázala metóda založená na zrážaní proteínov acetonitrilom a metanolom (AMV protokol) odstrániť albumín efektívnejšie ako ProteoPrep Blue Albumin and IgG Depletion kit. Proteínové spoty boli po prečistení séra AMV protokolom dobre separované a počet proteínových spotov sa signifikantne zvýšil. Navyše, AMV protokol zlepšil identifikáciu proteínov na MALDI-TOF hmotnostnom spektrometri.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Anderson, NL a Anderson, NG (2002) The Human Plasma Proteome. *Mol Cell* 11: 845 – 867.
- [2] Parkera, CE a Borchersa, CH (2014) Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation e Quality assurance and control of protein biomarker assays. *Mol Oncol* 8: 840 – 858.
- [3] Guo, X et al. (2015) Potential predictive plasma biomarkers for cervical cancer by 2D-DIGE proteomics and Ingenuity Pathway Analysis. *Tumor Biol* 36: 1711–1720.
- [4] Henkel, AW et al. (2012) Multidimensional plasma protein separation technique for identification of potential Alzheimer's disease plasma biomarkers: a pilot study. *Biomarkers: a pilot study* 119: 779 – 788.
- [5] Lim, LC et al. (2016) Identification of Differentially Expressed Proteins in the Serum of Colorectal Cancer Patients Using 2D-DIGE Proteomics Analysis. *Pathol Oncol Res* 22: 169 – 177.
- [6] Fang, X a Zhang, WW (2008) Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *J of Proteomics* 71: 284 – 303.
- [7] Roche, S et al. (2009) Depletion of one, six, twelve or twenty major blood proteins before proteomic analysis: The more the better? *J Proteomics* 78: 945 – 951.
- [8] Tirumalai, RS et al. (2003) Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome. *Mol Cell Proteomics* 2: 1096 – 1103.
- [9] Qui, F et al. (2015) Evaluation of two high-abundance protein depletion kits and optimization of downstream isoelectric focusing. *Mol Med Rep* 12: 7749 – 7755.
- [10] Tucholska, M et al. (2007) Endogenous peptides from biophysical and biochemical fractionation of serum analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization hybrid quadrupole time-of-flight. *Anal Biochem* 370: 228 – 245.
- [11] Holewinski, RJ et al. (2013) A fast and reproducible method for albumin isolation and depletion from serum and cerebrospinal fluid. *Proteomics* 13: 743 – 750.
- [12] Kay, R et al. (2008) Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22: 3255 – 3260.
- [13] Tucholska, M et al. (2010) The endogenous peptides of normal human serum extracted from the acetonitrile-insoluble precipitate using modified aqueous buffer with analysis by LC-ESI-Paul ion trap and Qq-TOF. *J Prot* 73: 1254 – 1269.
- [14] Matrix Science. <http://www.matrixscience.com>. http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html. [Online] Matrix Science, 2016. [Cited: 12th July 2018.]
- [15] Olver, CS et al. (2010) Comparison of methods for depletion of albumin and IgG from equine serum. *Vet Clin Pathol* 39: 337 – 345.
- [16] Ahmed, N et al. (2004) Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *Br J Cancer* 91: 129 – 140.
- [17] Riske, F et al. (2007) A potential generic downstream process using Cibacron Blue resin at very high loading capacity produces a highly purified monoclonal antibody preparation from cell culture harvest. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848: 108 – 115.
- [18] Seong, Y et al. (2017) Sample preparation for detection of low abundance proteins in human plasma using ultra-high performance liquid chromatography coupled with highly accurate mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1060: 272 – 280.

GÉNOVÁ ANALÝZA MIKROPROSTREDIA PRI KARCINÓME PRSNÍKA

A. Vážanová^{1,2}, P. Móricaová³, K. Kajo⁴, P. Slávik⁴, P. Žúbor³ a J. Hatok¹

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine)

²Klinika hematológie a transfúziológie, JLF UK a UNM v Martine

³Gynekologicko-pôrodná klinika, JLF UK a UNM v Martine

⁴Ústav patologickej anatómie, JLF UK a Univerzitná nemocnica Martin (UNM) v Martine

Korešpondujúca osoba:

Ing. Andrea Vážanová, PhD.
Univerzitná nemocnica Martin
Klinika hematológie a transfúziológie
Kollárova 2 - 036 01 Martin – SK
E-mail: stefanikova@jfm.uniba.sk

Abstrakt

Pokroky v genomike nám umožnili popísanie charakteristických črt karcinómu prsníka (KP), vedúce ku klasifikácii ochorenia na rôzne typy [1]. Využitím real-time qPCR môžeme pomocou analýzy génovej expresie definovať tzv. génové profily a odhaliť početné gény, ktoré môžu ovplyvniť rozvoj ochorenia, prognózu či úspešnosť liečby [2, 3]. Keďže štúdií, ktoré by sa zameriavali na génový profil histologicky normálneho tkaniva (HNT) z okolia KP je zatiaľ obmedzené množstvo, zvolili sme si za cieľ tento génový profil sledovať. V štúdii sme spracovali tkanivo KP a tkanivo z okolia karcinómu, odobraté pacientkam s KP s gradingom 3. Expresiu génov sme analyzovali pomocou real-time qRT-PCR reakcie na komerčných 96-jamkových platničkách s panelom primerov pre gény asociované s KP. Pre všetky sledované gény bol stanovený parameter zmeny expresie (RQ) ako parameter miery génovej expresie. Ukázalo sa, že z 84 sledovaných génov bolo v tkanive z okolia karcinómu 14 up-regulovaných a 10 down-regulovaných génov. Z toho však len 3 signifikantne up-regulované: *KRT5*, *CCNA1* a *SFRP1* ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$). Štatisticky významne bol down-regulovaný iba gén *NME1* ($p < 0.05$). Uvedené gény sa podieľajú na riadení bunkového cyklu, cez WNT-signalizáciu môžu ovplyvňovať apoptózu a tiež predikovať typ vznikajúceho karcinómu či metastatický potenciál tkaniva.

Profilácia vybraných génov medzi študovanými biologickými materiálmi karcinómu predstavuje iba zlomok pohľadu na úlohu mikroprostredia pri tumorovej progresii, no v kombinácii s ďalšími molekulovými charakteristikami, sa môže v konečnom dôsledku podieľať na vývoji nových liečebných stratégií.

Kľúčové slová: karcinóm prsníka, mikroprostredie, génová array

Úvod

Vďaka využitiu genomických metód akými sú microarraye či real-time qRT-PCR dnes vieme, že karcinóm prsníka nie je jedno ochorenie prejavujúce sa odlišnými histopatologickými a prognostickými vlastnosťami, ale práve naopak je to súbor ochorení jedného orgánu, ktoré sa okrem spomínaných histopatologických a prognostických vlastností líšia aj na genetickej a molekulárnej úrovni. Základné (klinické, histopatologické) rozdelenie je podľa prítomnosti = pozitivita (+), resp. neprítomnosti = negativita (-): estrogénového receptora (ER), progesterónového receptora (PR) a receptora 2 pre ľudský epidermálny rastový faktor (HER2). Vďaka multigénovej profilácii však karcinómy prsníka delíme na základe ich rozdielného genetického profilu na typy: *luminal A*, *luminal B*, *basal-like*, *normal breast-like* a *human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive* [4].

Génové arraye založené na qRT-PCR predstavujú tzv. *high-throughput* technológiu, ktorá kombinuje senzitivitu real-time PCR reakcie a vysokú profilovaciu schopnosť microarrayí. Dokážeme tak komplexne a cielene hodnotiť gény celej génovej rodiny, gény jednej signálnej dráhy či gény všeobecne asociované s určitým ochorením. Pri real-time PCR sledujeme množstvo amplikónu tvoreného počas reakcie monitorovaním množstva fluorescenie príslušnej farbičky. Má široký dynamický rozsah (až 6 stupňov), čím dokáže kvantifikovať nízko aj vysoko exprimované gény súčasne, čiže tie, ktoré majú nízku aktivitu aj tie, ktoré ju majú zvýšenú [3].

Jednou z prvých aplikácií génového profilovania založeného na microarrayi v rámci karcinómu prsníka bolo potvrdenie rozdielnosti KP na molekulárnej úrovni. Ukázalo sa, že ER+ a ER- karcinómy majú zásadne líšiaci sa profil génovej expresie. Nasledovali ďalšie štúdie, ktorých výsledky viedli k súčasnej klasifikácii karcinómu prsníka. Iné sa zamerali na predpoveď odpovede pacienta na liečbu a na celkovú prognózu ochorenia. Hoci nedokázali nahradiť tradičné spôsoby hodnotenia a klasifikácie karcinómu prsníka, komerčné microarraye a qRT-PCR arraye ponúkajú paralelnú prognostickú informáciu a v oblastiach, ako je napr. výskum nádorového mikroprostredia môžu byť šikovným nástrojom na komplexné génové skenovanie [4].

Do našej štúdie boli zaradené vzorky karcinómu prsníka luminálneho typu, teda s dobrou prognózou a k nemu prislúchajúce vzorky histologicky normálneho okolia tkaniva. Ukázalo sa totiž, že aj v histologicky normálnom tkanive sú prítomné podobné molekulárne abnormality ako v tkanive karcinómu [5].

Materiál a metódy

Súbor pacientov

Jednalo sa o prospektívnu štúdiu s 80 ženami s histologicky potvrdeným karcinómom prsníka, ktorým bol vykonaný chirurgický zákrok na Gynekologicko-pôrodníckej klinike JLF UK a UNM. Po získaní informovaného súhlasu boli pri chirurgickom zákroku pacientkam odobraté nasledujúce vzorky: tkanivo karcinómu prsníka (3-5 x 5 x 3-5 mm) a v rovnakom rozsahu aj histologicky normálne tkanivo z okolia karcinómu prsníka (≤ 2 cm od okraja karcinómu). Materiál bol odobratý a uskladnený pri -80°C na multigénovú analýzu. Zo všetkých pacientok, ktoré spĺňali kritéria výberu (primárny unilaterálny invazívny duktálny karcinóm ($n=71/80$), iba prípady s biologickými charakteristikami luminálneho A a luminálneho B karcinómu ($n=34$) a z nich ďalej tie s gradingom 3 ($n=16$) boli zvolené na multigénovú analýzu. Z nich sa iba v siedmich prípadoch podarilo vyizolovať dostatočné množstvo mRNA z tkaniva karcinómu prsníka a zároveň aj z histologicky normálneho tkaniva.

Tabuľka 1. Charakteristika súboru pacientov, ktorí boli finálne začlenení do štúdie, $n=7$.

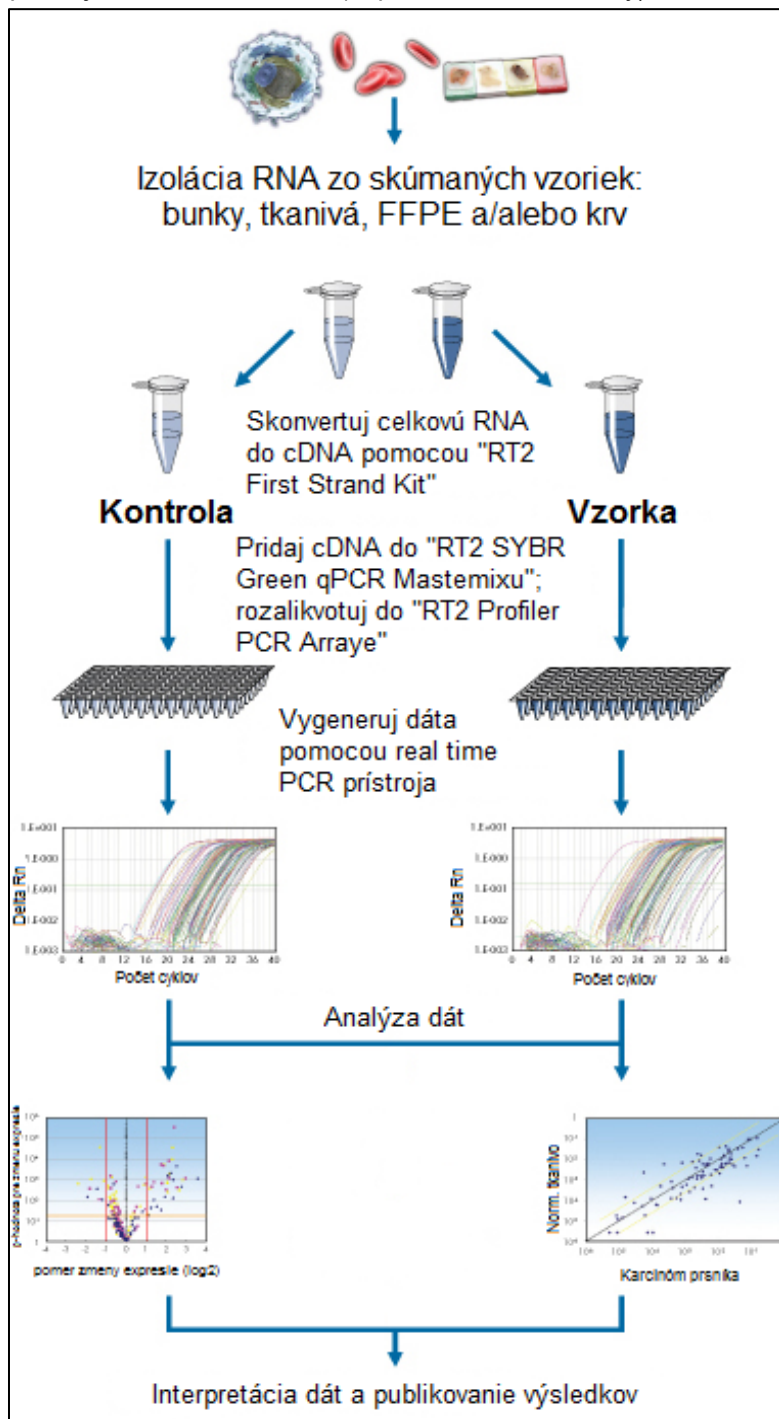
Typ karcinómu	DIK, Gr. 3, HER2 negat.
Vek	57,3 \pm 13,4 (priemer \pm sd)
BMI	27,17 \pm 4,94 (priemer \pm sd)

DIK - duktálny invazívny karcinóm; Gr. – grading; HER2 – receptor 2 pre ľudský endoteliálny faktor; sd – smerodajná odchýlka; BMI – z angl. body mass index.

Izolácia RNA

Vzorky tkaniva o veľkosti 5 x 5 x 3 mm získané pri chirurgickom zákroku boli okamžite umiestnené do plastových endorfových skúmaviek s RNA stabilizujúcim roztokom (RNAlater; Applied Biosystems/Ambion, USA) a zmrazené na -80 °C pre izoláciu RNA. RNA bola izolovaná pomocou kitu RNeasy Lipid Tissue (Qiagen Inc., USA). Koncentrácia RNA bola odmeraná spektrofotometricky na prístroji NanoPhotometer™ (Implen GmbH, Germany), odčítaním absorbancie na vlnovej dĺžke 260 nm

a jej čistota bola určená pomocou absorbančného indexu $AI=A_{260} \text{ nm}/A_{280} \text{ nm}$. Vzorky s $AI>1.8$ boli vybraté pre ďalšie analýzy. Kvalita každej RNA vzorky bola skontrolovaná na mikročipovej elektroforéze (MCE_-202 MultiNA, Shimadzu Biotech, Germany).



Obrázok 1. Schéma pracovného postupu od spracovania vzorky až k jej analýze. Upravené podľa schémy z webstránky QIAGEN

(<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=cdd2f728-1aca-4013-b043-4f9a69cfda78&lang=en>).

Syntéza cDNA a real-time qPCR

Syntéza komplementárnej DNA (cDNA) potrebnej pre PCR amplifikáciu bola získaná pomocou Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoScientific, USA). Mix reagensíí pozostával z nasledujúcich zložiek: 5x reakčný mix (4 µl); Maxima Enzyme Mix (2µl); RNA templát (5 µg) a sterilná voda bez nukleáz (výsledný objem 20 µl). Zmes sme jemne premiešali a inkubovali 10 min pri 25 °C, nasledovalo 15min pri 50 °C. Reakcia bola ukončená zahriatím 5 min na 85 °C. Nasyntetizovaný cDNA sme nariesili a pripravili na multigénovú analýzu použitím RT2 Profiler PCR Array (Qiagen, USA) v kombinácii s RT² SYBR® Green qPCR Mastermixom (Qiagen, USA).

Tabuľka 2. Prehľad analyzovaných génov. Zoradené sú podľa svojej funkcie.

Funkčná skupina génov	Funkčná podskupina génov	Analyzované gény
Markery klasifikácie tumoru	Luminálny A-C	ESR1 (ERa), FOXA1, GATA3, KRT8, KRT18, SLC39A6, TFF3, XBP1
	Basal-like / Trojito negatívny	BIRC5, EGFR, KRT5, NOTCH1
	HER2-like	ERBB2 (HER2), GRB7
	Metastázujúci do pľúc	ID1, MMP2 (Gelatinase A), PTGS2 (COX2)
Prenos signálov	Sprostredkovaný receptorom pre steroidy	AR, BRCA1, CCNE1, CTNNB1, ESR1 (ERa), ESR2 (ERβ), IGF1, KRT19, PGR, RB1
	„Hedgehog“ signalizácia	BCL2, CCND1, GLI1, SNAI2
	Glukokortikoidová dráha	IGFBP3, NME1 (NM23A), NR3C1 (GRL)
	Klasická WNT signalizácia	APC, CCND1, CTNNB1, SFRP1
	PI3K/AKT signalizácia	AKT1, ERBB2 (HER2), IGF1, IGF1R, PTEN
	NOTCH signalizácia	BIRC5, NOTCH1
	MAPK signalizácia	MAPK1 (ERK2), MAPK3 (ERK1), MAPK8 (JNK1), TP73
Epiteliálno-mezenchymálny prechod		CTNNB1, NOTCH1, SRC, TGFB1, TWIST1
Angiogenéza		CDH13, CTNNB1, EGF, ERBB2 (HER2), ID1, IL6, JUN, NOTCH1, PLA1 (uPA), PTEN, SERPINE1 (PAI-1), SLIT2, THBS1, VEGFA
Adhézia		ADAM23, APC, BCL2, CDH1 (E-Cadherin), CDH13, CDKN2A (p16INK4), CSF1 (MCSF), CTNNB1, EGFR, ERBB2 (HER2), PTEN, TGFB1, THBS1
Proteolýza		ADAM23, CST6, CTSD, MMP2 (Gelatinase A), MMP9 (Gelatinase B), PLA1 (uPA), PYCARD (ASC)
Apoptóza		AKT1, APC, BAD, BCL2, CDH1 (E-CADHERIN), CDH1 (E-CADHERIN)3, CDKN1A (P21CIP1/WAF1), CDKN2A (p16INK4), GSTP1, IGF1, IL6, JUN, MUC1, NME1 (NM23A), RARB, SFN (14-3-3s), SFRP1, TP53, TP73, TWIST1
Bunkový cyklus		APC, BCL2, CCNA1, CCND1, CCND2, CCNE1, CDK2, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), CDKN1C (p57KIP2), CDKN2A (p16INK4), JUN, MKI67, MYC, PTEN, RASSF1, RB1, SFN (14-3-3s), TP53
Poškodenie DNA		APC, ATM, BRCA1, BRCA2, CCND1, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), MAPK1 (ERK2), MGMT (AGT), MLH1, SFN (14-3-3s), TP53, TP73
Transport xenobiotík		ABCB1 (MDR-1), ABCG2 (BCRP)
Transkripčné faktory		AR, CTNNB1, ESR1 (ERa), ESR2 (ERβ), FOXA1, GATA3, HIC1, JUN, MYC, NOTCH1, NR3C1 (GRL), PGR, PRDM2 (RIZ1), RARB, RB1, TP53, TP73, XBP1

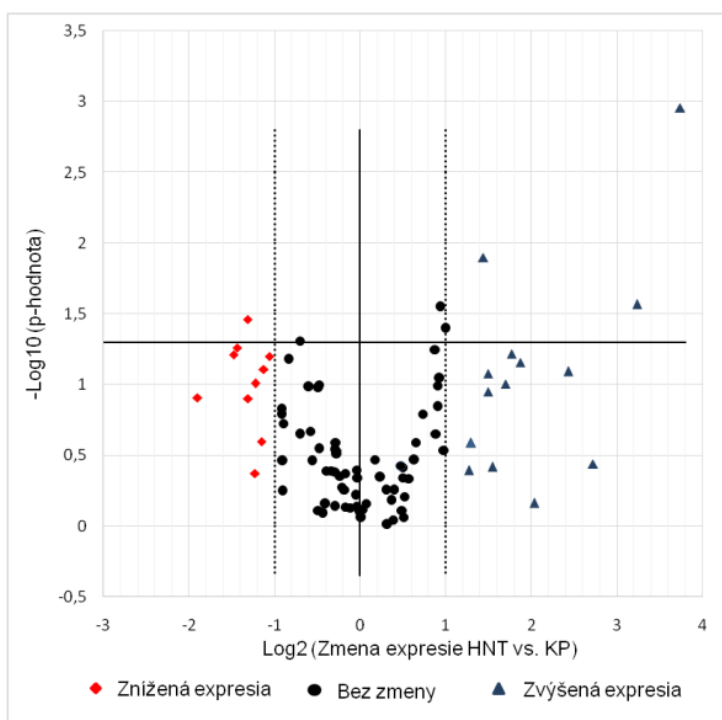
Analýza génovej expresie

Na sledovanie génovej expresie sme použili RT2 Profiler PCR Array, ktorej konfigurácia bola nasledovná: 5 endogénnych kontrol (actin beta (ACTB), beta-2-microglobulin (B2 M), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), hypoxanthine phospho ribosyl transferase (HPRT1), and ribosomal protein, large, P0 (RPLP0)), 3 gény na kontrolu kvality cDNA, 3 gény na kontrolu kvality priebehu PCR reakcie, 1 na detekciu prítomnosti gDNA a 84 génov, ktoré zohrávajú úlohu v karcinogenéze prsníka (Tab.2). Ako housekeepingový gén určený na normalizáciu výsledkov bol použitý gén pre endogénnu kontrolu RPLP0, nakoľko vykazoval najstabilnejšie hodnoty teplotných

kriviek. Relatívnu kvantifikáciu (RQ) génovej expresie sme vypočítali použitím on-line analyzačného centra dát na Qiagen web portále a bola vyjadrená ako „zmena expresie“. Zmena expresie ($2^{(-\Delta\Delta CT)}$) je podiel normalizovaného priemeru génovej expresie ($2^{(-\Delta CT_{KP})}$) v skupine vzoriek KP a normalizovaného priemeru génovej expresie ($2^{(-\Delta CT_{HNT})}$) v skupine vzoriek HNT. Hodnota zmeny expresie väčšia ako 1 znamená pozitívnu, zvýšenú expresiu, hodnota zmeny expresie menšia ako 1 znamená negatívnu, zníženú expresiu. P-hodnota bola určená Studentovým t-testom pre replikáty hodnôt $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ pre každý gén v skupine vzoriek HNT a KP.

Výsledky

Celkovo sme na každej arrayi stanovili mieru expresie 96 génov, z toho 7 génov ako vnútornú kontrolu kvality cDNA, kontrolu kvality priebehu PCR reakcie a na detekciu prítomnosti gDNA. Ďalších 5 génov boli označené ako „housekeeping gény“. Sledovaných génov asociovaných s KP bolo 84. Pri analýze sme porovnávali mieru génovej expresie v tkanive z okolia KP voči tkanivu karcinómu. Ukázalo sa, že z 84 sledovaných génov bolo v tkanive z okolia karcinómu 14 up-regulovaných (na obr. 2 predstavujúcich modré trojuholníky) a 10 down-regulovaných génov (červené kosoštvorce). Popisný prehľad týchto deregulovaných génov je v tabuľke 3.



Obrázok 2. Graf znázorňujúci zmenu expresie jednotlivých génov.

V grafe sú zvýraznené hranice zmeny expresie >2 (čiarkované zvislé čiary) v pozitívnom aj negatívnom smere a tiež hranica p-hodnoty $p \leq 0,05$ (vodorovná plná čiara).

Z nich však boli len 3 signifikantne up-regulované: *KRT5*, *CCNA1* a *SFRP1* ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$). Signifikantne down-regulovaný ($p < 0.05$) bol 1 gén, a to gén *NME1*. Uvedené gény sa podieľajú na riadení bunkového cyklu, cez WNT-signalizáciu môžu ovplyvňovať apoptózu a tiež predikovať typ vznikajúceho karcinómu či metastatický potenciál tkaniva. Prehľad deregulovaných génov s uvedením ich funkcie je v tabuľke 4.

Tabuľka 3. Prehľad všetkých deregulovaných génov (zmeny expresie >2) vo vyšetřovanom súbore HNT oproti KP.

Gén	↓ regulácia	p-hodnota < 0,05	Gén	↑ regulácia	p-hodnota < 0,05
MMP9	-3.73		SFRP1	13.39	0.001
MKI67	-2.78		KRT5	9.42	0.027
BIRC5	-2.70		TFF3	6.61	
NME1	-2.49	0.035	IGF1	5.39	
KRT8	-2.48		PGR	4.10	
THBS1	-2.35		ABCB1	3.66	
KRT19	-2.34		SLIT2	3.41	
SERPINE1	-2.22		CDKN1C	3.25	
CCNE1	-2.18		EGFR	2.92	
PLAU	-2.08		ABCG2	2.83	
			PTGS2	2.82	
			CCNA1	2.71	0.013
			EGF	2.46	
			BCL2	2.42	

Tabuľka 4. Prehľad deregulovaných génov v HNT v nadväznosti na ich funkciu v bunkových procesoch. Tmavou farbou sú označené gény, ktoré sú signifikantne deregulované s $p < 0,05$.

Funkcia génu v signálnych dráhach	↓ Regulácia v histologicky normálnom tkanive KP	↑ Regulácia v histologicky normálnom tkanive KP
„Notch“ signalizácia	BIRC5	
Glukokortikoidová signalizácia	NME1	
Steroidovým receptorom sprostredkovaná signalizácia	KRT19, CCNE1	IGF1, PGR
„WNT“ signalizácia		SFRP1
„PI3K/AKT“ signalizácia		IGF1
„Hedgehog“ signalizácia		BCL2
Funkcia génu v rozvoji typu karcinómu		
Typ „Basal-like“	BIRC5	KRT5, EGFR
Typ „Luminal A-C“	KRT8	TFF3
Potenciál metastázovania do pľúc		PTGS2
Funkcia génu v bunkových procesoch		
Proteolýza	MMP9	
Bunkový cyklus	MKI67, CCNE1	CDKN1C, CCNA1, BCL2
Apoptóza	NME1	SFRP1, IGF1, BCL2
Angiogenéza	THBS1, SERPINE1, PLAU	SLIT2, EGF
Adhézia	THBS1	EGFR, BCL2
Proteolýza	PLAU	
Transkripčné faktory		PGR
Transport xenobiťk		ABCB1, ABCG2

Záver

V tejto štúdii sme hodnotili génovú expresiu v tkanive priľahlom k tumoru, ktoré sa histologicky javilo ako normálne, od pacientov s HER2 negatívnym duktálnym invazívnym karcinómom. Primárnym cieľom bolo stanoviť génový profil asociovaný s karcinómom v histologicky normálnom tkanive prsníka a identifikovať bunkové signálne dráhy, ktoré sú najväčšmi ovplyvnené. Stanovený profil génovej expresie môže byť využitý na predikciu fenotypu karcinómu.

V histologicky normálnom tkanive odobratom z okolia karcinómu prsníka sme detegovali deregulované gény, ktoré by mohli určovať charakter rozvíjajúceho sa KP. Celkovo bolo deregulovaných 24 génov v HNT oproti KP. Najviac ovplyvnené boli gény pre „Secreted frizzled-related protein 1“ (SFRP1), Keratín 5 (KRT5), „Trefol factor 3“ (TFF3) a „Insulin-like growth factor 1“ (IGF1). Spolu s ostatnými génmi, ktoré boli deregulované +2, resp. -2 násobné, predstavovali zapojenie do kontroly bunkového cyklu, apoptózy, angiogenézy, viacerých signálnych dráh, transportu xenobiotík či predikcie typu vznikajúceho karcinómu. Zaujímavá môže byť korelácia získaných dát s génovým profilom prsníkového tkaniva pacientov bez KP.

Naše určenie úlohy mikroprostredia pri vývoji nádorového bujnenia pomocou transkriptomického profilácie môže spolu s kombináciou genomiky a proteomiky prispieť k determinovaniu molekulovej podstaty vzniku malignity ako aj individualizovanému prístupu k pacientovi počas liečby.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Guiu S, Michiels S, André F, et al. (2012) Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *AnnOncol* 23: 2997-3006.
- [2] Dunbier AK, Anderson H, Ghazoui Z, Salter J, Parker JS, Perou CM, Smith IE and Dowsett M (2011) Association between breast cancer subtypes and response to neoadjuvant anastrozole. *Steroids* 76: 736-740.
- [3] Arikawa E, Prabhakar S, Zhang H, et al. (2015) RT² Profiler PCR Array application examples Pathway-focused gene expression profiling in toxicology, oncology, and immunology research.
- [4] Reis-Filho JS, Pusztai L. (2011) Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 378(9805):1812-23.
- [5] Chen DT, Nasir A, Culhane A, Venkataramu C, Fulp W, Rubio R, Wang T, Agrawal D, McCarthy SM, Gruidl M, Bloom G, Anderson T, White J, Quackenbush J, Yeatman T (2010) Proliferative genes dominate malignancy-risk gene signature in histologically – normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 119:335–346.

SIGNÁLNE DRÁHY PREŽÍVANIA V SPOJITOSTI S NÁDOROVÝMI OCHORENIAMI MOZGU

A. Vážanová^{1,2}, J. Hatok² a P. Račay³

¹ *Klinika hematológie a transfúziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK v Martine) a Univerzitná nemocnica Martin*

² *Ústav lekárskej biochémie, JLF UK v Martine*

³ *Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine*

Korešpondujúca osoba:

Ing. Andrea Vážanová, PhD.
Univerzitná nemocnica Martin
Klinika hematológie a transfúziológie
Kollárova 2 - 036 01 Martin – SK
E-mail: stefanikova@jfmmed.uniba.sk

Abstrakt

Počas malígnej transformácie spojenej s rozvojom glioblastómov dochádza k narušeniu regulácie viacerých vnútrobunkových signálnych dráh, čo potom vedie k odolnosti malígnych buniek voči apoptóze, zvýšenej schopnosti proliferácie buniek ako aj k rezistencii gliómov na rádio- a chemoterapiu. Na týchto z hľadiska rozvoja a liečby malígnych ochorení nežiaducich javoch sa výrazne podieľajú signálne najmä dráhy PI3K/Akt a MEK/ERK. Tieto dráhy často pracujú komplexne čo znamená, že sa navzájom ovplyvňujú a regulujú rôznymi spätnými väzbami a ich komplexnosť sa tiež prejavuje spoločným pôsobením na rovnaké substráty.

Kľúčové slová: PI3K/Akt, Ras/Raf/MEK/ERK, glioblastóm

Úvod

Jednou zo základných črt nádorových buniek je ich schopnosť rásť a prežívať spôsobom, ktorý porušuje normálnu homeostázu bunkového prostredia [1]. Signálne dráhy, regulujúce proliferáciu a rast buniek ako aj ich odolnosť voči apoptóze označujeme ako signálne dráhy prežívania [1]. Rezistencia voči apoptóze je výsledkom zmien na genómovej, transkripčnej a postranskripčnej úrovni, čo ovplyvňuje funkciu bielkovín, bielkovinových kináz a substrátov ich transkripčných faktorov. PTEN/PI3K/Akt/mTOR/NF-kappaB a Ras/Raf/MEK/ERK dráhy sú signálnymi dráhami prežívania, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v onkogenéze. Komponenty týchto dráh bývajú pri onkologických ochoreniach vrátane glioblastómov často mutované či nesprávne exprimované [3]. Napríklad strata funkcie tumor supresorového génu PTEN často prispieva k zvýšenej regulácii PI3K/Akt dráhy. Obidve dráhy sú pri glioblastómoch v zvýšenej miere aktivované aj vďaka signalizácii na Ras [4]. Ras síce nebýva mutovaný, k jeho zvýšenej regulácii však dochádza prostredníctvom stimulácie receptorov rastových faktorov (genetická zmena EGFR v 37%) alebo inaktiváciou NF-1, negatívneho regulátora Ras (bodovými mutáciami v 15%) [5].

PTEN/PI3K/Akt/mTOR/NF-kappaB

PI3K

Fosfoinozitol 3- kinázy (PI3K) sú charakteristické svojou schopnosťou fosforylovať 3-OH skupinu v inozitolových lipidoch. Na základe sekvenčnej homológie a substrátovej špecificity ich delíme do troch skupín: trieda I, II a III, v ktorých sa nachádza 8 enzýmov. Sú to heterodimerické enzýmy zložené z regulačnej a katalytickej jednotky, ktorá sú pre každú triedu rozdielne [6]. K aktivácii dochádza fosforyláciou prostredníctvom RTK, G-proteínových receptorov alebo Ras. Prebieha na plazmatickej membráne. Aktivované PI3K fosforylujú lipid fosfatidyl-inozitol bisfosfát (PIP2) na fosfatidyl-inozitol trisfosfát (PIP3). Vzniknuté produkty slúžia ako druhý poslovia v bunkovej signalizácii. PIP3 priťahuje k bunkovej membráne bielkoviny obsahujúce PH (pleckstrin homology) doménu, akými sú napr. aj kinázy Akt a PDK1 [7]. Aktivita PI3K je kontrolovaná a negatívne regulovaná fosfatázami – PTEN, SHIP-1 a SHIP-2. PTEN je duálne špecifická lipid/bielkovinová fosfatáza, ktorá odstraňuje 3'-fosfát z PIP3 ale aj PIP2. SHIP-1 a SHIP-2 odstraňujú 5-fosfát z PIP3. Vlastný, od toho v cytoplazme nezávislý metabolizmus inozitolových lipidov prebieha aj v jadre [8].

Akt

Akt, tiež označovaná ako bielkovinová kináza B (PKB) je 57 kDa serín-treonínová kináza. Poznáme tri izoformy Akt: Akt1 (α), Akt2 (β), Akt3 (γ), ktoré obsahujú PH- doménu na N-konci, centrálnu katalytickú (kinázovú) doménu a regulačnú oblasť na C-konci. Akt1 je vysoko exprimovaná takmer všade s výnimkou obličiek, pečene a sleziny. Hladina expresie Akt2 je medzi orgánmi rozdielna. Vyššiu hladinu nájdeme v kostrovom svalu, orgánoch tráviaceho traktu a v reprodukčných tkanivách. Akt3 nájdeme vysoko exprimované najmä v mozgu a semenníkoch [9].

Aktivácia Akt je viacstupňový proces, ktorý zahŕňa jednak presun Akt k cytoplazmatickej membráne a ďalej dvojnásobnú fosforyláciu reťazca Akt. Membránové PIP3 lipidy pritiahnu Akt a dochádza k ich interakcii s PH doménou Akt. Toto spojenie spôsobuje konformačnú zmenu, na základe ktorej je Akt prístupná fosforylácii. Prvé fosforylačné miesto je pre Akt1 na treoníne 308 (Thr 308), na kinázovej doméne, a je fosforylované PDK1 kinázou. Druhé miesto leží na C-konci – serín 473 (Ser 473) a je fosforylované kinázou označovanou ako PDK2, ktorej identita ale nie je celkom objasnená. Zdá sa, že túto funkciu plní hneď niekoľko kináz v závislosti od konkrétnych podmienok. Najviac spomínaný je mTOR komplex 2 (mTORC2), ktorý fosforyluje Ser473 najmä pri raste alebo stimulácii mitogénom [11]. Rovnako ako v cytoplazme aj v jadre je aktivácia Akt bielkoviny viacstupňový proces, ktorý v prvom kroku zabezpečujú PIP3 lipidy. Nasledujúcu fosforyláciu na Thr308 zabezpečuje aj v jadre sa nachádzajúca PDK1. Ako PDK2 kináza pre fosforyláciu na Ser473 slúži DNA-závislá protein kináza (DNA-PK), ktorá podľa Bozulicza a Hemmingsa, ale aj ďalších, pôsobí v stresových situáciách akými sú poškodenie DNA alebo prítomnosť CpG DNA [11].

Ras/Raf/MEK/ERK

Ras

Extracelulárne stimuly ako rastové faktory, cytokíny, mitogény, hormóny, oxidačný a tepelný stres [12] spúšťajú signalizáciu interakciou tyrozín kinázových receptorov, G-proteínových receptorov alebo receptorov epidermálneho rastového faktora. Signál prenášaný z týchto receptorov potom stimuluje GTP k väzbe na Ras. Táto premena aktivuje Ras a umožňuje jeho interakciu so širokým spektrom efektorových bielkovín. Následná stimulácia cytoplazmatických bielkovín Raf, MEK a ERK (komplexne nazývané MAPK kinázy) vyústi do regulácie transkripcie génov [13].

Raf

Raf je označenie pre rodinu serín-treonínových bielkovinových kináz pozostávajúcu z A-Raf, B-Raf, Raf-1 (C-Raf). Raf bielkovina je aktivovaná obvyčajne malým G-proteínom (Ras). K aktivácii dochádza na plazmatickej membráne. Je to viacstupňový proces, ktorý začína presunutím sa Raf ku plazmatickej membráne na základe signálu z Ras [14]. Raf bielkovina ďalej dimerizuje [15] a fosforyluje sa na viacerých miestach vo svojich doménach [16]. Raf aktivita je ešte modulovaná aj Bag1, 14-3-3 bielkovinou [17] a bielkovinou tepelného šoku 90 (Hsp90). Hsp90 slúži na stabilizáciu aktivovaného Raf [18]. Na molekule Raf-1 je najmenej 13 regulačných fosforylačných miest [9]. Akt a bielkovinová kináza A (PKA) fosforylujú S259 na Raf-1, a tým inhibujú jeho aktivitu. Takto, na seríne fosforylované Raf sa spájajú so 14-3-3 bielkovinou a ostávajú neaktívne [19].

MEK

Rodina mitogénom aktivovaných bielkovinových kináz (MEK) obsahuje u cicavcov 3 izoformy: MEK1, MEK1b a MEK2. Mitogénom aktivovaná bielkovinová kináza/ERK kináza (MEK) je tyrozín a serín/treonín špecifická bielkovinová kináza. Štúdie na MEK1 a MEK2 deficientných mutovaných myšiacich línii ukazujú, že MEK1 dokáže svojou funkciou nahradiť MEK2 ale naopak to nefunguje [20].

Aktivita MEK je pozitívne regulovaná fosforyláciou prostredníctvom Raf na serínových zvyškoch katalytickej domény (Ser218, Ser222 pre MEK1) [21]. Fosforylovať a aktivovať MEK dokáže každý z troch členov Raf rodiny. Okrem spomenutých dvoch fosforylačných miest sú na MEK aj ďalšie (na Ser386 a Thr292, kde prebieha fosforylácia pomocou ERK a na Ser298 pomocou p21 aktivačnej bielkoviny). MEK fosforylovaná na týchto miestach potom v závislosti od ďalších podmienok buď pozitívne alebo negatívne ovplyvňuje činnosť ERK. Deaktivácia MEK sa deje defosforyláciou Ser218 a Ser222 najmä účinkom fosfatázy PP2A, ale do úvahy prichádzajú aj ďalšie fosfatázy [23].

ERK

Extracelulárnym signálom regulované kinázy 1 a 2 (ERK) sú serín-treonínové kinázy, ktoré obsahujú katalytickú doménu okolo ktorej sú regulačné úseky [24]. ERK1 (44 kDa) a ERK2 (42 kDa) sú homológne izoformy, ktoré zdieľajú širokú substrátovú špecificitu. Ich substráty sa nachádzajú v cytoplazme, jadre, membránach a aj v cytoskelete [23]. ERK často vykazujú nielen rozdielne ale aj protichodné funkcie v tých istých bunkách. Činnosť ERK2 je spájaná s proliferáciou, zatiaľ čo ERK1 dokáže inhibovať účinok ERK2 v určitých bunkách [25]. Výsledky rôznych štúdií naznačujú, že rozdiely vo funkciách ERK1 a ERK2 môžu súvisieť viac s hladinou ich expresie ako so samotnými substrátmi na ktoré vplyvajú. ERK1 sa na signalizácii podieľa viacej počas G2/M fázy, zatiaľ čo ERK2 viacej počas G1 fázy bunkového cyklu [26].

Za normálnych podmienok je ERK ukotvená v cytoplazme a napojená na MEK [27], sieť mikrotubúl [28] alebo fosfatázy [29]. ERK sú aktivované duálnou fosforyláciou prostredníctvom MEK1/MEK2 na regulačných Tyr a Thr zvyškoch [30], pričom dochádza ich disociácii od MEK1/2. ERK je jediným fyziologickým cieľom MEK. Deaktivácia ERK prebieha účinkom fosfatáz na jednom alebo oboch regulačných Thr a Tyr zvyškoch [31]. Fosfatázami, ktoré defosforylujú ERK sú PP2A (Ser/Thr fosfatáza) [32], PTP-SL (Tyr fosfatáza) [33] a duálna MAPK fosfatáza (MKP) [34]. Aj samotné ERK dokážu pomocou viacerých spätných väzieb kontrolovať svoju aktivitu, najmä po určitom čase pôsobenia

stimulu. Medzi takéto spätné väzby vykonávané ERK patria inhibičné fosforylácie Sos [35], Raf [36] a MEK [22].

Vplyv PI3K/Akt a MEK/ERK na apoptózu, bunkový cyklus a syntézu bielkovín

Pri aktivovanej PI3K/Akt dráhe je to prostredníctvom fosforylácie proapoptotickej bielkoviny Bad, ktorá následne homodimerizuje a tým nie je schopná vytvárať heterodimér s antiapoptotickou bielkovinou Bcl-XL inhibujúcou apoptotickú bielkovinu Bax. Zároveň tiež dochádza k zvýšeniu aktivity MDM2 ubikvitín ligázy, ktorej najvýznamnejším substrátom je tumorsupresorová bielkovina p53. Ubikvitinizácia p53 prostredníctvom MDM2 ligázy vedie k degradácii p53 proteasomálnym systémom [37]. Pomocou fosforylácie bielkovín Foxo rodiny vplýva Akt negatívne na expresiu bielkoviny Bim a zabraňuje transkripcii génov pre bielkoviny blokujúce bunkový cyklus (p27Cip1, p21Cip1) [38]. Zároveň je však Akt schopná prostredníctvom aktivácie NF- κ B indukovať expresiu antiapoptotických bielkovín Bcl-2, Bcl-XL [39] a bunkových inhibítorov apoptózy cIAP-1, -2 [40]. Akt podporuje napredovanie bunkového cyklu jednak už spomenutým zablokovaním Foxo faktorov, ale aj priamou deaktiváciou fosforyláciou inhibítora cyklín-závislej kinázy 2 p27Kip1 [41]. Bunkovú proliferáciu podporuje Akt inhibíciou glykogén syntázy kinázy-3. Výsledkom je akumulácia cyklínu D1, promotera bunkového cyklu [42]. Na transláciu bielkovín vplýva Akt najmä prostredníctvom mTORC1. K jeho aktivácii dochádza pomocou malej bielkoviny Rheb. Akt umožňuje túto aktiváciu tým, že inhibuje TSC2, ktorého úlohou je inhibovať Rheb [43].

Aktivovaná MEK/ERK sa okrem iného prejavuje fosforyláciou proapoptotickej bielkoviny Bim, čo vedie k zvýšenej ubiquitinizácii spomínanej bielkoviny a jej následnej degradácii proteasomálnym systémom. Okrem toho prostredníctvom špecifickej regulácie translácie dochádza k zvýšeniu hladiny antiapoptotickej bielkoviny Mcl-1, Bcl-2 či Bcl-XL [37]. ERK tiež prispieva k inhibícii apoptózy deaktiváciou fosforyláciou iniciátorovej kaspázy 9 [44]. Napredovanie bunkového cyklu a proliferáciu ovplyvňuje ERK priamou fosforyláciou transkripčných faktorov alebo prostredníctvom RSK, ktoré aktivuje. Aktivované RSK sa presúvajú do jadra bunky, kde fosforylujú transkripčné faktory akými sú SRF a CREB, ktoré spôsobia zvýšenú produkciu skorých génov (c-Fos, c-Jun, Nur77) [45]. Aktivitu skorých génov dokážu potom regulovať aj samotné ERK [46]. Okrem toho aktivuje regulátor bunkového cyklu cyklín D1 a negatívne reguluje anti-proliferatívne bielkoviny Tob1, Foxo3a a p21 [27], [28].

Záver

Terapia malígnych gliómov predstavuje v neurochirurgii a onkológii stále veľkú výzvu. Nielen že sa na vzniku malígnych gliómov podieľa viacero signálnych dráh so zmenenou signalizáciou, ale naviac hematoencefalická bariéra obmedzuje prívod množstva chemoterapeutík k nádoru. Efektívnosť doterajších pokusov zacieliť terapiu na signálne dráhy prežívania pri týchto typoch nádorov je veľmi nízka. Kombinácia špecifických inhibítorov viacerých signálnych, prípadne viacerých cieľov v rámci jednej dráhy môže dosiahnuť synergický efekt a predchádzať vzniku liekovej rezistencie [47].

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646-74.
- [2] Morokoff A.P., Novak U. Targeted therapy for malignant gliomas. *J Clin Neurosci*. 2004; 11: 807-818.
- [3] Lefranc F., Rynkowski M., DeWitte O., Kiss R. Present and potential future adjuvant issues in high-grade astrocytic glioma treatment. *Adv Tech Stand Neurosurg*. 2009; 34: 3-35. Review.
- [4] Newton H.B. Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 2: PI3K/Akt/PTEN, mTOR, SHH/PTCH and angiogenesis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2004; 4: 105-28.

- [5] Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I.M., Gallia G.L. a kol. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008; 321: 1807–1812.
- [6] Franke T.F. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene*. 2008 27: 6473–88.
- [7] Manning B.D., Cantley L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007; 129(7): 1261-74.
- [8] Martelli A.M., Faenza I., Billi A.M., Manzoli L., Evangelisti C., Falà F., Cocco L. Intracellular 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis. *Cell Signal*. 2006; 18(8): 1101-7.
- [9] Steelman L.S., Pohnert S.C., Shelton J.G., Franklin R.A., Bertrand F.E., McCubrey J.A. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004; 18: 189–218.
- [10] Hanada M., Feng J., Hemmings B.A. Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1697: 3–16.
- [11] Bozulic L., Hemmings B.A. PI3K/Akt: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2009; 21(2): 256-61.
- [12] Cobb M.H., Goldsmith E.J. How MAP kinases are regulated. *The Journal of biological chemistry*. 1995; 270: 14843–14846.
- [13] Geyer M., Wittinghofer A. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997; 7: 786–792.
- [14] Yan J., Roy S., Apolloni A., Lane A., Hancock J.F. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 24052–24056.
- [15] Luo Z., Tzivion G., Belshaw P.J., Vavvas D., Marshall M., Avruch J. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature*. 1996; 383: 181–185.
- [16] Fabian D.R., Daar I.O., Morrison D.K. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 7170–7179.
- [17] Fantl W.J., Muslin A.J., Kikuchi A., Martin J.A., MacNicol A.M., Gross R.W., Williams L.T. Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature*. 1994; 371: 612–614.
- [18] Blagosklonny M.V. Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. *Leukemia*. 2002; 16(4):455-62. Review.
- [19] Rommel C., Clarke B.A., Zimmermann S., Nuñez L., Rossman R., Reid K, Moelling K., Yancopoulos G.D., D.J. Glass D.J. Differentiation stage specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*. 1999; 286: 1738–1741.
- [20] Bélanger L.F., Roy S., Tremblay M., Brott B., Steff A.M., Mourad W., Hugo P., Erikson R., Charron J. Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(14):4778-87.
- [21] Alessi D.R., Saito Y., Campbell D.G., Cohen P., Sithanandam G., Rapp U., Ashworth A., Marshall C.J., Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*. 1999; 13(7): 1610-9.
- [22] Slack-Davis J.K., Eblen S.T., Zecevic M., Boerner S.A., Tarcsfalvi A., Diaz H.B., Marshall M.S., Weber M.J., Parsons J.T., Catling A.D. PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J. Cell Biol*. 2003; 162(2): 281-91.
- [23] Shaul Y.D., Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773(8): 1213-26.
- [24] Boulton T.G., Nye S.H., Robbins D.J., Ip N.Y., Radziejewska E., Morgenbesser S.D., DePinho R.A., Panayotatos N., Cobb M.H., Yancopoulos G.D. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991; 65: 663–675.
- [25] Pouyssegur J., Volmat V., Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem. Pharmacol*. 2002; 64(5-6): 755-63.
- [26] Liu X., Yan S., Zhou T., Terada Y., Erikson R.L. The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene*. 2005; 763–776.
- [27] Fukuda M., Gotoh Y., Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J*. 1997; 16(8):1901-8.
- [28] Reszka A.A., Seger R., Diltz C.D., Krebs E.G., Fischer E.H. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1995; 92(19): 8881-5.
- [29] Karlsson M., Mathers J., Dickinson R.J., Mandl M., Keyse S.M. Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *J. Biol. Chem*. 2004; 279(40): 41882-91.
- [30] Payne D.M., Rossomando A.J., Martino P., Erickson A.K., Her J.H., Shabanowitz J., Hunt D.F., Weber M.J., Sturgill T.W. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*. 1991; 10(4): 885-92.
- [31] Yao Z., Seger R. The molecular mechanism of MAPK/ERK inactivation. *Curr. Genom*. 2004; 5: 385–393.
- [32] Alessi D.R., Gomez N., Moorhead G., Lewis T., Keyse S.M., Cohen P. Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr. Biol*. 1995; 5(3): 283-95.
- [33] Pulido R., Zúñiga A., Ullrich A. PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J*. 1998; 17(24): 7337-50.
- [34] Sun H., Charles C.H., Lau L.F., Tonks N.K. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*. 1993; 75(3): 487-93.
- [35] Corbalan-Garcia S., Yang S.S., Degenhardt K.R., Bar-Sagi D. Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Mol. Cell. Biol*. 1996; 16: 5674–5682.

- [36] Dougherty M.K., Muller J., Ritt D.A., Zhou M., Zhou X.Z., Copeland T.D., Conrads T.P., Veenstra T.D., Lu K.P., Morrison D.K. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol. Cell.* 2005; 17: 215–224.
- [37] McCubrey J.A., Steelman L.S., Franklin R.A., Abrams S.L., Chappell W.H., Wong E.W., Lehmann B.D., Terrian D.M., Basecke J., Stivala F., Libra M., Evangelisti C., Martelli A.M. Targeting the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and p53 pathways in hematopoietic drug resistance. *Adv. Enzyme Regul.* 2007; 47: 64-103.
- [38] Greer E.L., Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 2005; 24(50): 7410-25.
- [39] Konishi T., Sasaki S., Watanabe T., Kitayama J. Nagawa H. Overexpression of hRFL inhibits 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells via activation of NF- κ B and upregulation of BCL-2 and BCL-XL. *Oncogene.* 2006; 25: 3160–3169.
- [40] Kreuz S., Siegmund D., Scheurich P., Wajant H. NF- κ B inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 3964–3973.
- [41] Cappellini A., Tabellini G., Zweyer M., Bortul R., Tazzari P.L., Billi A.M. a kol. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway regulates cell cycle progression of HL60 human leukemia cells through cytoplasmic relocation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) and control of cyclin D1 expression. *Leukemia.* 2003; 17: 2157–2167.
- [42] Simon M., Grandage V.L., Linch D.C., Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/b-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene.* 2005; 24: 2410–2420.
- [43] Rosner M., Freilinger A., Hengstschlager M. Akt regulates nuclear/cytoplasmic localization of tuberlin. *Oncogene.* 2007; 26: 521–531.
- [44] Milella M., Precupanu C.M., Gregorj C., Ricciardi M.R., Petrucci M.T., Kornblau S.M., Tafuri A., Andreeff M. Beyond single pathway inhibition: MEK inhibitors as a platform for the development of pharmacological combinations with synergistic anti-leukemic effects. *Curr Pharm Des.* 2005; 11(21): 2779-95. Review.
- [45] Cataldi A., di Giacomo V., Rapino M., Genovesi D., Rana R.A. Cyclic nucleotide Response Element Binding protein (CREB) activation promotes survival signal in human K562 erythroleukemia cells exposed to ionising radiation/etoposide combined treatment. *J. Radiat. Res.* 2006; 47(2): 113-20.
- [46] Murphy L.O., Smith S., Chen R.H., Fingar D.C., Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell. Biol.* 2002; 4: 556–564.
- [47] Wong M.L., Kaye A.H., Hovens C.M. Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes. *J Clin Neurosci.* 2007; 14(4): 301-8.

„Tento zborník prác vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: VYTVORENIE NOVÉHO DIAGNOSTICKÉHO ALGORITMU PRI VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH OCHORENIACH, ITMS kód projektu: 26220220022, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja



„Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ“

Elektronické vydanie: Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
Ústav lekárskej biochémie
Malá Hora 4D
036 01 Martin

Počet strán: 114

Úprava: doc. RNDr. Jozef HATOK, PhD.
Ing. Zuzana HATOKOVÁ, PhD.

Vydané: november 2018

ISBN 978-80-8187-054-5

EAN 9788081870545