

# Onkologie

B

2012

[www.solen.cz](http://www.solen.cz)

ISSN 1802-4475

ROČNÍK 6.

## Abstrakta / Abstract book

### VIII. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie

29.– 30. listopadu 2012, Olomouc

**Konference je spojená se slavnostním otevřením  
Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc**

POŘADATEL

Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc

Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

**SOLEN**  
MEDICAL EDUCATION



**ZYTOVISION**  
Molecular diagnostics simplified

ZytoLight® Products for FISH analysis

## Companion diagnostics of today and tomorrow

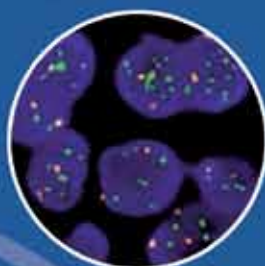
— The lung cancer FISH probe pool of ZytoVision —



FGFR1



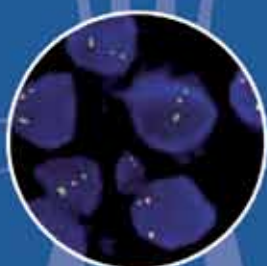
FGFR2



FGFR3



ALK



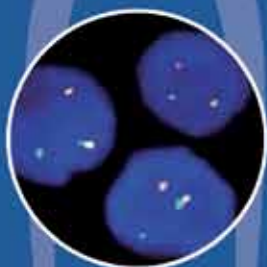
EML4



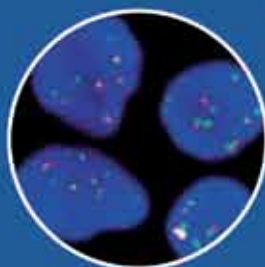
MET



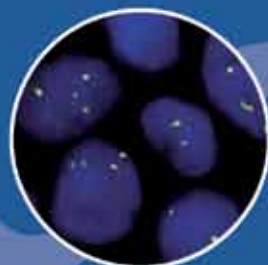
ROS1



RET



EGFR



KIF5B



CARS



TFG



**Pragostem**

Pragostem s.r.o. | Baranova 1802/21 | Praha 3 | CZ-130 00  
e-mail: [bruna@pragostem.cz](mailto:bruna@pragostem.cz) | tel.: +(420) 725 930 929 | [www.pragostem.cz](http://www.pragostem.cz)



#### POŘADATEL

- Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc
- Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

#### Odborná garance

- Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti ČLS JEP
- Komplexní onkologické centrum Olomouc
- Nadace pro výzkum rakoviny – Rakovina věc veřejná

**SOLEN**  
MEDICAL EDUCATION

# VIII. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie

29.–30. listopadu 2012, Olomouc

#### POŘADATEL

Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc  
Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

#### ODBORNÁ GARANCE

Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti ČLS JEP  
Komplexní onkologické centrum Olomouc  
Nadace pro výzkum rakoviny – Rakovina věc veřejná

#### PREZIDENT AKCE

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

#### ORGANIZAČNÍ VÝBOR

doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D., RNDr. Radek Trojanec, Ph.D., MUDr. Kateřina Bouchalová, Ph.D.,  
MUDr. Petr Džubák, Ph.D., MUDr. Josef Srovnal, Ph.D., MUDr. Marek Svoboda, Ph.D., RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

#### ORGANIZÁTOR

**SOLEN, s. r. o.** Lazecká 297/51, 779 00 Olomouc,  
Kontaktní osoba: Mgr. Herta Šústková  
tel.: 585 209 207, mob.: 777 622 039, e-mail: sustkova@solen.cz

Olomouc 29. – 30. 11. 2012, HOTEL FLORA OLOMOUC

Účast je v rámci celoživotního postgraduálního vzdělávání dle Stavovského předpisu č.16 ČLK ohodnocena 16 kredity pro lékaře, 8 kredity pro sestry a vysokoškolsky vzdělaný nelékařský personál.

Supplementum B časopisu Onkologie  
Evidence MK ČR po číslem 17305  
Citační zkratka: Onkologie 2012; 6(Suppl. B). ISSN 1803-5922

Časopis je indexován v Bibliographia Medica Československa  
a v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR.

# PROGRAM

ČTVRTEK 29. listopadu 2012

9.00–9.20 Slavnostní zahájení konference a představení projektu BIOMEDREG a Ústavu molekulární a translační medicíny – Hajdúch Marián

9.20–11.00 **Triple negativní karcinom prsu**

- Triple negativní karcinom prsu – Svoboda Marek
- Triple negativní karcinom prsu z pohledu patologa – Fabián Pavel
- Neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer – Melichar Bohuslav
- BCL2 as a predictive marker in triple-negative breast cancer treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy – Bouchalová Kateřina
- Kontroverze v terapii triple negativního karcinomu prsu – Ćwierotka Karel

11.00–11.15 Přestávka

11.15–12.30 **Nádory CNS**

- Léčebná strategie u gliomů WHO gr. III. Čtyřleté zkušenosti Komplexního onkologického centra Olomouc – Kalita Ondřej
- Účinek valproátu na expresi CD133 v buňkách neuroblastomu – Khalil Asharf M.
- MikroRNA jako biomarkery a terapeutické cíle u high-grade gliomů – Šána Jiří
- Quantitative methylation analysis of HOXA3, 7, 9, and 10 genes in glioma: association with tumor WHO grade and clinical outcome – Gohlke Henning

12.30–13.30 Přestávka na oběd

13.30–15.10 **Funkční genomika v biomedicínském výzkumu**

- Functional Genomics program in BIOCEV and the Czech Centre for Phenogenomics – Sedláček Radislav
- Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer – Kořínek Vladimír
- The use of transgenic and knockout animals for studies of embryonic development – Kozmík Zbyněk
- Mechanistic basis of hybrid sterility in mice – Forejt Jiří



Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



15.10–15.30 Přestávka

15.30–16.45 **Molekulární biologie kolorektálního karcinomu**

- Charakteristiky MLH1 genu u pacientů se sporadicky se vyskytujícím kolorektálním karcinomem – Procházka Pavel
- Okultní nádorové buňky u pacientů s kolorektálním karcinomem – negativní prognostický faktor – Srovnal Josef
- Role miR-215 v patogenезi kolorektálního karcinomu – Slabý Ondřej
- Význam dlouhých nekódujících RNA u nádorových onemocnění – Šána Jiří

16.45–17.00 *Přestávka*

17.00–18.45 **Nádorové biomarkery I**

- **Nové trendy ve výzkumu mikroRNA u solidních nádorů** – Slabý Ondřej
- **Možnosti vyšetření genu Her-2 u pacientů s karcinomem prsu** – Koudeláková Vladimíra
- **Biopsia SLU u vybraných pacientok s duktálním karcinómem *in situ* – kazuistika** – Marcinová Marta
- **Polyzomie chromozomu 17 u olomouckého souboru pacientek s karcinomem prsu** – Trojanec Radek
- **Primární řasinky buněk gastrointestinálních stromálních tumorů** – Dvořák Josef

20.00 *Společenský večer*

*PÁTEK 30. listopadu 2012*

9.00 – 11.00 **Nádorové biomarkery II**

- **MikroRNA jako diagnostické a prognostické biomarkery renálního karcinomu** – Héžová Renata
- **Analýza mutace p.Val600Glu genu *BRAF* u pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy** – Drábek Jiří
- **Prognostický význam minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem plic** – Benedíková Andrea
- **Genetický polymorfismus vybraných reparačních genů bazové exciznej reparácie v karcinogéně plic** – Letková Lucia
- **Raritní případ současného výskytu dvou mutací genu *EGFR* u pacienta s NSCLC z hlediska laboratorní diagnostiky** – Robešová Blanka
- **Vysokokapacitní DNA sekvenování v molekulární diagnostice onkologických markerů EGFR signální dráhy** – Vojta Petr
- **p16 – aktuální pohled na diagnostiku karcinomu cervixu** – Richter Milan

11.00–11.20 *Přestávka*

11.20–12.50 **Poškození a modifikace DNA**

- **Intracelulární sekvestrace ellipticinu – příčina chemorezistence a možnost zesílení účinku?** – Hraběta Jan
- **Cellular DNA damage response in the context of cell cycle** – Mistrík Martin
- **Telomerase – an unusual enzyme with unusual functions** – Kramara Juraj
- **Study of epigenetic 5-azacytidine nucleosides and their derivatives** – Agrawal Khushboo
- **ATR-Chk1-APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7-ASK/Dbf4 kinase complex is required for DNA damage bypass pathway** – Yamada Masayuki

12.50–13.45 *Přestávka na oběd*

13.45–15.30 **Nová protinádorová léčiva**

- ***In vitro* testování účinnosti na komplementu závislé cytotoxicity monoklonálních protilátek určených pro léčbu B-buněčných malignit** – Borský Marek
- ***In vitro* proteomické profilování buněčné linie CEM platinovými protinádorovými léčivy** – Oždian Tomáš
- **Identifikace cílů protinádorových léčiv pomocí afinitní purifikace** – Rylová Gabriela
- **Vliv inhibitorů histondeacetylas na protinádorový účinek etoposidu** – Groh Tomáš
- **Deriváty kyseliny betulinové inhibují Gli1/2 zprostředkovanou proliferaci glioblastomu** – Řehulka Jiří
- **SAR analýza 2-fenylsubstituovaných-3-hydroxychinolin-4(1H)-one-karboxamidů na základě jejich vlivu na regulaci buněčného cyklu a toxicity vůči vybraným nádorovým buněčným liniím** – Konečný Petr

15.30 *Slavnostní ukončení konference a předání ceny za nejlepší přednášku a poster.*



## Postery

1. **Biodegradabilní komplexy doxorubicinu aplikované na pleteniny pro cílenou léčbu** – Bezděková Andrea
2. **The monitoring of the doxorubicin in animal muscle tissue** – Blažková Iva
3. **Prognostic role of PIK3CA mutations and PIK3R1 underexpression in breast cancer** – Čížková Magdalena
4. **Komparace dvou kazuistik maligního meningeomu s rozdílnými genetickými aberacemi** – Delongová Patricie
5. **Mutace KRAS (G12S) u pacienta s NSCLC léčeného erlotinibem – kazuistika** – Fiala Ondřej
6. **Význam EGFR amplifikace u pacientů s NSCLC, nositelů wild-type EGFR genu, léčených EGFR-TKI** – Fiala Ondřej
7. **Chromium exposure and lung cancer development** – Halašová Erika
8. **Analýza vybraných mikroRNA ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám karcinomu jícnu** – Hejžová Renata
9. **Využití hmotnostně spektrometrických metod pro analýzu biomarkerů v biologickém materiálu** – Holub Dušan
10. **Hladiny miR-210 v nádorové tkáni a funkční efekty jejího utlumení na buňky renálního karcinomu** – Iliev Robert
11. **Srovnání profilu zinkových proteinů v buňkách karcinomu prostaty vystavených působení Zn (II)** – Jílková Eva
12. **miR-205 jako prognostický marker u triple-negativního karcinomu prsu** – Juráček Jaroslav
13. **Androgen depletion induces neuroendocrine differentiation and senescence-associated secretory phenotype in prostate cancer** – Kharraishvili Gvantsa
14. **Expres nestinu i v nádorových buňkách hematologických malignit – leukemií a lymfomů** – Loja Tomáš
15. **Korelace prognostických markerů LAG3, LPL a ZAP70 s mutačním stavem IGHV pacientů s chronickou lymfocytární leukemií** – Mádrová Hana
16. **Význam hypoxie a HIF-1 $\alpha$  pro vznik chemorezistence u buněčných linií odvozených od lidského neuroblastomu** – Maříková Helena
17. **Genetic variability in the MTHFR and ACE genes and colorectal cancer risk in Slovak population** – Matáková Tatiana
18. **Expres N-terminálních izoform proteinu p73 v buněčných liniích derivovaných z neurogenních nádorů s aberantním počtem centrosomů** – Mikulenková Erika
19. **Cirkulující nádorové buňky u pacientů s kastrací rezistentním karcinomem prostaty jako součást individualizace systémové léčby** – Mikulová Veronika
20. **Metodické aspekty analýzy extracelulárních mikroRNA v moči pro účely diagnostiky urologických nádorů** – Mlčochová Hana
21. **Změny teploty tání DNA pro studium kovalentních interakcí DNA s cisplatinou** – Nejdí Lukáš
22. **Analýza účinku metotrexátu na buněčné linie ze solidních nádorů dětského věku** – Pavlasová Gabriela
23. **Analysis of selected microRNAs in prostate cancer cell lines** – Raudenská Martina
24. **Využití nanočástic stříbra k eliminaci bakteriální infekce *Staphylococcus aureus*** – Sklenář Matěj
25. **Výživa versus zhoubný novotvar** – Slováček Ladislav
26. **Genetický polymorfismus mismatch reparačního genu hMLH1 ve vztahu ku karcinomu plic** – Slováková Petra
27. **Hodnocení perifokálního edému u kazuistik glioblastomů grade IV s imunofenotypem VEGF (+), NNOS (+) a hodnocení amplifikace TP53 A HER2/C-NEU** – Staněk Libor
28. **Využití molekulárních metod v bioptické diagnostice maligního melanomu** – Staněk Libor
29. **Studium interakce rostlinných steroidů s receptory pro steroidní hormony u nádorů prsu a prostaty** – Steigerová Jana
30. **Analysis of pro- and antiapoptotic genes in prostate cancer** – Sztalmachová Markéta
31. **Mutace v KRAS, BRAF, PIK3CA genu a jednonukleotidový polymorfismus (SNP) ve vazebném místě pro let-7 mikroRNA v 3'-UTR oblasti KRAS genu (KRAS-LCS6) u pacientů s kolorektálním karcinomem** – Šimová Jarmila
32. **The role of nuclear receptors in prostate and colon cancer after exposure to fatty acids and PPAR ligands** – Zapletal Ondřej

## Triple negativní karcinom prsu

čtvrtek / 29. listopadu 2012 / 9.20–11.00 hod.

### Triple-negativní karcinom prsu

Marek Svoboda

Klinika komplexní onkologické péče

a Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů,  
Masarykův onkologický ústav, Brno

Triple-negativní karcinom prsu (TNBC) představuje heterogenní skupinu karcinomů prsu, které neexprimují estrogenový receptor- $\alpha$ , progesteronový receptor a receptor Her-2. V populaci evropských žen prevalence kolísá mezi 10 až 25 %, v České republice činí přibližně 15 %. Největší podskupinu TNBC (70 až 90 %) tvoří „basal-like“ karcinomy (BL-TNBC), zbývající část nemá prokázanou expresi cytokeratinů bazálního typu a/nebo EGFR. Na úrovni profilu genové exprese, v histologickém obraze a svým chováním sdílí TNBC a BL-TNBC významnou podobnost s karcinomy nesoucími mutaci nádorového supresorového BRCA1 genu. Tuto asociaci potvrzují i relativně vysoký výskyt vícečetných malignit u pacientek s TNBC a jejich mladší věk. Nicméně TNBC se mohou vyskytovat u žen v každém věku. Obecně jsou TNBC považovány za nádory s agresivním chováním, pro které je charakteristická jejich extrémně vysoká proliferace a sklon k hematogennímu metastazování. Medián celkového přežití se u tohoto podtypu karcinomu prsu nejčastěji pohybuje do 5 let, přičemž většina relapsů (70 %) nastává do 3 let od diagnózy a většina úmrtí do 5 let (až 90 %). Na straně druhé se z větší části jedná o nádory velmi senzitivní k iniciální chemoterapii, která tak tvoří základ jejich léčby. Protože až do současnosti neexistují pro TNBC silné prediktivní a prognostické markery, výběr algoritmu léčby (neoadjuvance vs. adjuvance, zařazení adjuvanční radioterapie) a režimu chemoterapie se řídí všeobecně platnými pravidly, která jsou akcentována předpokládanou chemosenzitivitou onemocnění a benefitem z agresivní léčby i u pacientek nad 65 let věku. V neoadjuvanci i adjuvanci se nejčastěji uplatňují režimy založené na kombinaci antracyklinů a taxánů. S ohledem na předpokládanou patogenézi části TNBC, která je asociována s poruchou BRCA1 genu a tím i reparačních mechanismů DNA, jsou v rámci klinického hodnocení testována klasická cytostatika, která způsobují poškození DNA (např. karboplatina, cisplatina), a cílené látky, jež negativně interferují s dalšími mechanismy oprav DNA (PARP inhibitory). Mimo to jsou testovány látky cílící na angiogenezi, signální dráhy

EGFR receptoru, mTOR a src. V rámci přednášky bude prezentována základní epidemiologická, molekulární a klinická charakteristika tohoto onemocnění, s důrazem na informace důležité pro klinickou praxi.

### Triple-negativní karcinom prsu z pohledu patologa

Pavel Fabián

Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Triple-negativní karcinomy prsu (TNBC) jsou z pohledu histomorfologie (včetně aktuální WHO klasifikace) heterogenní skupina nádorů. Jsou definovány negativním výsledkem imunohistochemických testů na přítomnost ER, PR a Her-2. Imunohistochemie je metoda robustní, je však závislá na dodržení parametrů preanalytické fáze (tj. formalinové fixace). Opožděná, nedostatečná či naopak nadměrná fixace mohou vést k falešně negativním výsledkům testů a tedy i k falešné klasifikaci nádoru jako TNBC.

Triple-negativní fenotyp je typický zejména pro metaplastické karcinomy, dále pro část invazivních (duktálních) karcinomů bez bližší specifikace a některé další „speciální“ histologické typy (karcinom medulární a karcinom s medulárními rysy, adenoidně cystický karcinom, karcinomy podobné nádorům slinných žláz apod.). Triple-negativní imunoprofil mají jen vzácně i ty karcinomy, které jinak řadíme mezi luminální, tedy ER+ nádory (např. lobulární). Silná je i korelace TN fenotypu s vysokým gradem (Nottingham score).

### Neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer

Bohuslav Melichar

Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

The progress in the understanding of molecular bases of cancer resulted in the recognition of the fact that breast cancer is not a single disease, but a spectrum of tumors affecting one organ. In the spectrum of breast tumors, triple-negative breast cancer is characterized by aggressive biological behavior and poor prognosis. Unlike luminal carcinomas that express hormone receptor or tumors with high expression of human epidermal growth factor receptor (HER)-2, there are no obvious therapeutic targets in triple negative breast cancer. The

development of an effective therapeutic strategy in triple-negative breast cancer has been hampered by the fact that most clinical trials of adjuvant or neoadjuvant therapy enrolled patients irrespective of the phenotype. Thus, the number of patients with triple-negative carcinoma was low in individual trials. The advantage of neoadjuvant approach is that it allows relatively rapid evaluation of a parameter that has been shown to be associated with relapse-free survival and overall survival, i.e. pathological response. Pathological complete response rate is high in triple-negative breast cancer. Although the long-term prognosis of patients in whom pathological complete response was achieved is excellent, the relapse rate in patients who had no pathological complete response is high, resulting in so called “triple-negative paradox”. There is cumulative evidence that more intense chemotherapy regimens increase the pathological complete response rate in triple-negative breast cancer. Moreover, some chemotherapeutic drugs that are still not commonly used in neoadjuvant setting in breast cancer have high activity in patients with triple-negative breast cancer, mainly patients carrying BRCA1 mutation. There are also data indicating that the activation of immune response may play an important role in the pathological response.

### BCL2 as a predictive marker in triple-negative breast cancer treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy

Kateřina Bouchalová<sup>1,2</sup>, Marek Svoboda<sup>3</sup>,  
Gvantsa Kharashvili<sup>4</sup>, Lenka Radová<sup>1</sup>,  
Jan Bouchal<sup>4</sup>, Radek Trojanec<sup>1</sup>,  
Vladimíra Koudeláková<sup>1</sup>, Marián Hajdúch<sup>1</sup>,  
Karel Čwierka<sup>5</sup>, Zdeněk Kolář<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

<sup>3</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno

<sup>4</sup>Laboratory of Molecular Pathology, Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

<sup>5</sup>Oncology Clinic, Olomouc

**Background:** Neither targeted therapy, nor predictors for chemotherapy sensitivity are available for triple-negative breast cancer (TNBC). Preclinical data show an association of BCL2 expression and resistance to anthracyclines. The absence of BCL2 expression in prechemotherapy samples is associated with a higher probability of pathological complete response to neoadjuvant doxorubicin-based chemotherapy. The objective of our study was to test whether BCL2 expression could predict outcome in TNBC patients treated with adjuvant chemotherapy.

**Methods:** The study included 187 patients with TNBC, 178 of whom were treated with adjuvant chemotherapy (164 had anthracycline-based chemotherapy). BCL2 protein was assessed by immunohistochemistry.

**Results:** High BCL2 expression predicted poor relapse free survival (RFS) in patients treated with adjuvant anthracycline-based regimens (logrank  $p=0.035$ , hazard ratio, HR 2.37, 95 % CI 1.04–5.41) and a trend to poor overall survival (OS) (logrank  $p=0.085$ ). In multivariate analysis of these patients, BCL2, size and nodal status had an independent predictive significance for both RFS and OS.

**Conclusions:** High BCL2 expression predicted poor outcome in TNBC treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. BCL2 expression could facilitate decision making on adjuvant treatment in TNBC patients. In patients with high BCL2 expression other types of available adjuvant treatment should be considered. Clinical trials with PARP inhibitors or

anti-BCL2 targeted therapy could be another possibility for these patients.

**Grants:** IGA NS10286, IGA NS10357–3, and Biomedreg CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

### **Kontroverze v terapii „triple“ negativního karcinomu prsu**

Čwierтка Karel<sup>1</sup>, Bouchalová Kateřina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Onkologická klinika FN Olomouc a LF UP

<sup>2</sup>ÚMTM LF UP

Hormonálně nezávislé (ER-, PR-) karcinomy prsu bez zvýšené exprese proteinu HER2/neu představují 15–25 % všech karcinomů prsu. Vyskytují se zvláště u mladších žen a jsou spojovány s horší prognózou a časným výskytem metastáz v parenchymových orgánech. Nejedná se však o homogenní skupinu nemocí. V dnešní době je rozlišována celá řada podtypů jako „basal-like“, s mutacemi genu BRCA1, s nízkou expresí claudinu, se zvýšenou expresí EGFR, se zvýšenou expresí androgenních receptorů, s expresí genů imunitní odpovědi a další.

U časných karcinomů začínají kontroverze v otázce typu chirurgického zákroku. Vzhledem k časté přítomnosti mutací genu BRCA1, které jsou považovány za významný rizikový faktor vzniku karcinomu prsu, řada pracovišť se přiklání k mastektomii jako k základnímu typu chirurgického řešení. Analýzy studií však nezjistily významné rozdíly v léčebných výsledcích po mastektomiích ve srovnání s prs šetřícími zákroky. Je nutné upozornit na skutečnost, že některé

studie popisují vyšší riziko selhání pooperační radioterapie po prs šetřících zákrocích u této skupiny nemocných.

V případě systémové léčby řada publikací dává do souvislosti poruchy mechanismů reparace DNA se zvýšenou citlivostí k látkám poškozujícím DNA. Tímto se vysvětluje významná účinnost platinových derivátů u „triple“ negativních karcinomů prsu. Dosud není zřejmé, který z léčebných režimů lze považovat za optimální, zda kombinaci platinového derivátu s taxanem nebo v některých případech režim CMF (cyklofosfamid, methotrexát, 5-fluorouracil), jaká je úloha antracyklinů a zda epothilony jsou lepší než taxany. Velmi nadějně se jeví výsledky studií používající inhibitory poly(ADP-ribose)polyméraz (PARP). U části „triple“ negativních karcinomů prsu se zvýšenou expresí EGFR se může jevit jako účelné použití monoklonálních protilátek. Zajímavé jsou i výsledky studií hodnotící inhibitory angiogeneze. Zvýšená exprese androgenních receptorů a gonadoliberinových receptorů otevírá nové možnosti ovlivnění zvláště recidivujícího metastatického onemocnění. První publikované výsledky jsou velmi zajímavé.

Z dosavadních výsledků studií je zřejmé, že je nutné dále intenzivně studovat charakteristiky jednotlivých podtypů a zdokonalovat možnosti predikce odpovědi na léčbu. Lze očekávat, že lepší přizpůsobení léčby charakteristikám nádoru povede k lepším výsledkům terapie.

*Práce podpořena grantem IGA MZd NT 13564–4/2012*



## Nádory CNS

čtvrtek / 29. listopadu 2012 / 11.15–12.30 hod.

### Léčebná strategie u gliomů WHO gr. III. Čtyřleté zkušenosti Komplexního onkologického centra Olomouc

Ondřej Kalita<sup>1</sup>, Miroslav Vaverka<sup>1</sup>,  
Lumír Hrabálek<sup>1</sup>, Miloslava Zlevorová<sup>2</sup>,  
Eva Čecháková<sup>3</sup>, Radek Trojanec<sup>4</sup>,  
Magdalena Knebllová<sup>4</sup>, Jiří Ehrmann<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Neurochirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

<sup>2</sup>Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

<sup>3</sup>Radiologická klinika LF UP a FN Olomouc

<sup>4</sup>Laboratoř experimentální medicíny, Institut molekulární a translační medicíny (BIOMEDREG) LF UP v Olomouci

<sup>5</sup>Ústav molekulární a klinické medicíny UP LF a FN Olomouc, Institut molekulární a translační medicíny (BIOMEDREG) LF UP v Olomouci

**Úvod:** Anaplastické gliomy WHO gr. III. tvoří 6–10 % všech nově diagnostikovaných, primárních nádorů mozku v dospělém věku. Dělí se na tři typy: anaplastický astrocytom, anaplastický oligoastrocytom a anaplastický oligoastrocytom. Jde o problematickou skupinou nitrolebních nádorů, které mají v současnosti dvě velká úskalí. První je určení diagnózy. Přestože cílem poslední WHO klasifikace z roku 2007 bylo jasně definovat grade a typ nádoru, je postup identifikace nádoru nadále pod nemalým vlivem subjektivního postoje patologa (např. odlišení glioma grade II a III, klasifikace oligodendrogliálních nádorů s nekrozou, diagnostika smíšených gliomů, nepřítomnost nekrozy k určení diagnózy WHO gr. IV, ...). Druhým problémem je léčba gliomů WHO III. Dosud publikované výsledky nedaly jednoznačné doporučení ohledně onkologické léčby (solo radioterapie, solo chemoterapie, konkomitantní chemo-radioterapie). Dle výsledků posledních studií se však zdá, že pro prognózu a indikaci typu léčby budou podstatnější výsledky molekulárně-genetických, cytogenetických vyšetření jako IDH, 1p/19q, methylace MGMT promotoru.

**Metoda:** Od 3/2007 do 3/2011 jsme prospektivně sledovali pacienty s gliomy WHO gr. III. Byly získávány informace o operacích, klinickém stavu nemocných, MRI, PET/CT FLT vyšetřeních, výsledcích histologických, imunohistochemických, molekulárně-genetických a cytogenetických vyšetřeních. Základem byla radikální ex-

stirpace TU. Biopsie byla prováděna u pacientů >75 let, s KS<60 a u neoperovatelných nádorů. Ke snížení subjektivní v histologické diagnostice byl definitivní nález vždy konzultován se seniorním neuro-patologem naší nemocnice. Pacientům s anaplastickým astrocytomy WHO gr. III, v dobrém stavu (KS>60), s radikální operací byl doporučen Stuppův režim onkoterapie. U smíšených gliomů a oligodendrogliálních gliomů byla doporučována radioterapie. Důležitým vodítkem bylo časné pooperační MRI a klinický stav nemocných. Všichni pacienti docházeli na pravidelné MRI a klinické kontroly.

**Výsledek:** Byla zajištěna heterogenní skupina 55 pacientů. Okolo 70 pacientů podstoupilo operaci, zbytek biopsií. Dle předpokladu pacienti s anaplastickým astrocytomy, kteří podstoupili operaci a konkomitantní chemo-radioterapii, měli lepší prognózu, než pacienti po biopsii následovanou Stuppovou onkoterapií. U operací up-gradovaných gliomů WHO gr. III je podstatné zaměřit se na postkontrastně se sytící ložiska (hot-spots) diagnostikovaná na MRI a PET/CT FLT. U recidiv nádoru byl prokázán pozitivní efekt opakované nebo nově nasazené chemoterapie. Byl také potvrzen pozitivní vliv radikality operace, oligodendrogliální komponenty nádoru, kodelece 1p/19q, methylace promotoru MGMT a mutace IDH.

**Závěr:** I přes omezený počet zpracovaných gliomů WHO gr. III se autoři snaží ukázat své zkušenosti s léčbou těchto nemocných. Snahou bylo vytvořit cílenou léčbu pro každou skupinu nádorů.

*Práce byla zčásti podpořena z grantů IGA ČR č. NT11065–5/5/2010 a č. NT13581–4/2012 (86–91).*

### Účinek valproátu na expresi CD133 v buňkách neuroblastomu

Ashraf M. Khalil<sup>1</sup>, Jan Hraběta<sup>1</sup>,  
Šimon Cipro<sup>1,2</sup>, Aleš Vicha<sup>1</sup>,  
Tomáš Eckschlager<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF FN Motol, Praha

<sup>2</sup>Ústav patologie a molekulární medicíny, UK 2. LF a FN Motol, Praha

Předpokládá se, že nádorové kmenové buňky (CSC) hrají významnou úlohu při vzniku a progresi nádorů a mohou být jednou z příčin chemorezistentních relapsů. CD133 je marker CSC u řady nádorů, hlavně CNS a neuroblastomu

(NBL). Jeho zvýšená exprese je u nich známkou horší prognózy. NBL je nádor z gangliových buněk sympatiku s velmi variabilním biologickým chováním provázeným typickými genetickými změnami. Epigenetická terapie se považuje za jednu z možností cílené terapie zaměřené na CSC. Inhibitory histondeacetylázy jsou zkoumány jako nová skupina cílených protinádorových léků, protože mohou indukovat expresi epigeneticky umlčených genů. Jedním z nich je valproát (VPA), používaný jako antiepileptikum u kterého jsme prokázali indukci apoptózy v NBL buňkách. Cílem naší studie bylo posoudit účinek VPA na CSC u NBL buněk.

NBL buňky (linie UKF-NB-3, UKF-NB-4, IMR32, SK-N-AS a SHSY5Y) jsme kultivovali v médiu IMDM s 10 % séra a v bezsérovém médiu (SFM) (advanced DMEM/F12 medium s EGF, BFGF, heparinem a B27). Linie UKF-NB-3 a SHSY5Y exprimovaly CD133 (detekováno western blotem) a po inkubaci s VPA se exprese CD133 zvyšovala (western blot a RT PCR v reálném čase) a zvyšovalo se zastoupení CD133+ buněk (průtoková cytometrie) a přítomnost VPA zvyšovala klonogenicitu in vitro. Zbylé tři linie, které neexprimovaly CD133, jej nezačaly exprimovat ani po inkubaci s VPA, a ten u nich klonogenicitu nezvyšoval. Sféry v bezsérovém médiu vytvářely linie UKF-NB-3, UKF-NB-4 a IMR32, které mají amplifikován gen MYCN. Buňky SK-N-AS a SHSY5Y, které nemají MYCN amplifikaci, sféry nevytvářely.

Z toho lze usuzovat:

- 1 buněčné linie se významně liší v expresi CD133, která je považovaná za jeden z markerů CSC u NBL
- 2 různé metody detekce CSC (CD133, klonogenicitu, tvorba sfér) nemusí korelovat a patrně zachycují různá stadia CSC
- 3 naše nálezy vzbuzují podezření, že VPA může stimulovat růst CSC, možný mechanismus relativního zvýšení CD133+ buněk zničením CD133- jsme nepotvrdili.

### MikroRNA jako biomarkery a terapeutické cíle u high-grade gliomů

Jiří Šána<sup>1,2</sup>, Radek Lakomý<sup>1</sup>, Andrej Beše<sup>1,2</sup>,  
Simona Hankeová<sup>1</sup>, Leoš Křen<sup>3</sup>,  
Pavel Fadrus<sup>4</sup>, Martin Smrčka<sup>4</sup>,  
Rostislav Vyzula<sup>1</sup>, Ondřej Slabý<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno

<sup>3</sup>Ústav patologie, Fakultní nemocnice Brno, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

<sup>4</sup>Klinika neurochirurgie, Fakultní nemocnice Brno, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

High-grade gliomy jsou vysoce maligní primární nádory mozku vznikající transformací podpůrných gliálních buněk. I přes optimální průběh léčby zahrnující radikální resekci následovanou chemo- a/nebo radioterapií zůstává prognóza pacientů velmi špatná. Hlavní příčinou je častá chemo-radiorezistence těchto nádorů, která se klinicky projevuje časnou progresí onemocnění po ukončení onkologické léčby nebo ještě v jejím průběhu. Hlavními cíli translačního výzkumu gliomů jsou proto jednak přesná predikce odpovědi na léčbu a jednak snaha o vývoj nových adjuvantních terapeutických přístupů umožňujících překonání rezistence. Významnou roli v chemo-radiorezistenci hrají nádorové kmenové buňky, a tedy i signální dráhy spojené s udržováním kmenových vlastností těchto buněk. Výzkum gliomových kmenových buněk (GSCs) navíc potvrdil jejich asociaci s časem dogrese a celkovým přežíváním pacientů.

Nedávno bylo zjištěno, že biologické vlastnosti GSCs mohou být efektivně regulovány pomocí mikroRNA (miRNA), krátkých endogenních molekul RNA, které post-transkripčně regulují genovou expresi. MiRNAs byly v mnoha případech popsány jako deregulované u gliomů a expresní hladiny některých z nich korelují právě s odpovědí na léčbu a celkovým přežíváním pacientů. Toto sdělení bude zaměřeno na současné poznatky o zapojení miRNA do biologie GSCs a prezentaci výsledků našeho výzkumu v této oblasti.

*Tato práce byla podpořena granty Interní Grantové Agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky NT13514–4/2012 a NT11214–4/2010; projektem "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068); a Institucionálními zdroji pro Podporu výzkumných organizací poskytnutou Ministerstvem zdravotnictví České republiky v roce 2012.*

### **Quantitative methylation analysis of HOXA3, 7, 9, and 10 genes in glioma: association with tumor WHO grade and clinical outcome**

Henning Gohlke

Field Applications Scientist at Sequenom GmbH, Hamburg, Germany

**Purpose:** The purpose of this study was to determine whether specific HOXA epigenetic signatures could differentiate glioma with distinct biological, pathological, and clinical characteristics.

**Methods:** We evaluated HOXA3, 7, 9, and 10 methylation in 63 glioma samples by MassARRAY and pyrosequencing.

**Results:** We demonstrated the direct statistical correlation between the level of methylation of all HOXA genes examined and WHO grading. Moreover, in glioblastoma patients, higher level of HOXA9 and HOXA10 methylation significantly correlated with increased survival probability (HOXA9-HR: 0.36,  $P = 0.007$ ; HOXA10-HR: 0.46,  $P = 0.045$ ; combined HOXA9 and 10-HR 0.28,  $P = 0.004$ ).

**Conclusions:** This study identifies HOXA3, 7, 9, and 10 as methylation targets mainly in high-grade glioma and hypermethylation of the HOXA9 and 10 as prognostic factor in glioblastoma patients. Our data indicate that these epigenetic changes may be biomarkers of clinically different subgroups of glioma patients that could eventually benefit from personalized therapeutic strategies.

## Funkční genomika v biomedicínském výzkumu

čtvrtek / 29. listopadu 2012 / 13.30–15.10 hod.

### Functional Genomics program in BIOCEV and the Czech Centre for Phenogenomics

Radislav Sedláček

Institute of Molecular Genetics AS CR Prague, and BIOCEV, Biotechnology and Biomedicine Center of the AS CR and CU in Prague, Vestec

Genomes of humans, mice and other species have been completely sequenced but the knowledge of genome sequences as such does not shed light on questions concerning the functions of these sequences. Among the unanswered questions are those regarding the functions of most of the genes that encode proteins. In order to describe biological functions of a gene, an informative modification must be inserted into genomes. In order to annotate the function of human genes, functional genomics needs to be combined with e.g. comparative genomics, i.e. the function of human genome should be derived from the function of an orthologous genetic product, e.g. in mice.

Our research program of functional genomics, supported by the Czech Centre for Phenogenomics (CCP), aims at creating and analyzing animal models (mice, rats) for the purpose of annotating the function of human genes. The results thus obtained can subsequently be used to understand the factors substantial in the development of human diseases and to find effective new treatments. Research program will be based on several research areas – pillars for which an all-encompassing term of ‘phenogenomics’ can be used. Among the particular pillars are functional and comparative genomics combined with functional genetics and genetic engineering.

In our research program, phenogenomics plays a dual role: it identifies genes vital for the function of specialized physiological systems and, secondly, it enables their validation as targets for developing new pharmaceuticals.

*Výstup byl připraven za podpory projektu OPVK CZ 1.07/2.3.00/20.0102 „Vytváření expertního týmu centra enogenomiky“*

### Wnt signaling in intestinal stem cells – an insight from lineage-tracing experiments in transgenic mice

Vladimír Kořínek

Institute of Molecular Genetics AS CR, v.v.i., Prague, and BIOCEV, Biotechnology and Biomedicine Center of the AS CR and CU in Prague, Vestec

The epithelia of the gastrointestinal tract represent one of the most rapidly self-renewing tissues in the adult mammalian body. The tract lining is concurrently exposed to chemical stress and mechanical tensions. Consequently, the combination of high proliferation rate and environmental stress results in the accumulation of somatic mutations hitting tumor suppressor genes or proto-oncogenes. More than 50 % of all colorectal tumors harbor inactivating mutations in the APC gene. Intriguingly, some recent discoveries clarified the link between the Wnt signaling pathway, the cellular function of APC and uncontrolled cell growth initiating the path to cancer.

In the healthy intestine the Wnt signaling pathway is active in a small population of the

intestinal stem cells. This population is located in the bottom part of the microscopic invagination of the epithelium called the crypts. The loss of the APC gene results in non-physiological activation of the Wnt pathway in the cells outside of the crypt. Therefore, the cells harboring mutant APC preserve typical features of stem cells, i.e. proliferation capacity and „immortality“. Consequently, these cells constantly proliferate and generate polyps. The majority of sporadic human colorectal cancers are initiated by this molecular mechanism.

The talk will be focused on recent discoveries involving the identification of specific markers of the intestinal stem cells and methods how these cells (and their progeny) can be labeled and traced in living experimental animals. The contribution of Wnt signaling to normal stem cell physiology and to tumor initiation and progression will also be presented.

*Výstup byl připraven za podpory projektu OPVK CZ 1.07/2.3.00/30.0027 „Tvorba centra transgenních technologií“*

### The use of transgenic and knockout animals for studies of embryonic development

Zbyněk Kozmík

Institute of Molecular Genetics AS CR, v.v.i., Prague, and BIOCEV, Biotechnology and Biomedicine Center of the AS CR and CU in Prague, Vestec

Transgenic and knockout animals are widely used as experimental models to perform phenotypic studies. In addition, transgenic animals represent a valuable tool for the identification and



Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



characterization of regulatory sequences which are responsible for tissue- and/or stage-specific expression of any given gene. Loss-of-function studies are typically performed by gene disruption (gene knockout). Although the first generation of constitutive (germline) knockout mice has provided useful insight into the gene function, the utility of such strains is often hampered by the early embryonic lethality. Therefore, most of the effort in recent years has been forwarded into production of mouse strains that allow conditional gene inactivation. Cre/loxP system has been the most widely used tool in a mouse model, with new Cre and floxed mouse strains generated continuously either by individual lab efforts or by large international consortia. Here, I will primarily discuss the use of genetically modified mice and fish in the context of developmental biology research, with a special focus on eye development.

Výstup byl připraven za podpory projektu OPVK CZ 1.07/2.3.00/30.0027 „Tvorba centra transgenických technologií“

### Mechanistic basis of hybrid sterility in mice

Jiří Forejt

Institute of Molecular Genetics AS CR Prague, and BIOCEV, Biotechnology and Biomedicine Center of the AS CR and CU in Prague, Vestec

Meiosis is a highly conserved developmental program of sexually reproducing organisms resulting in formation of haploid gametes. Besides ensuring proper segregation of homologous chromosomes into gametes and meiotic recombination of paternal and maternal genomes, meiosis functions as a selective barrier preventing certain chromosomal and genic mutations from transfer to next generations. The resulting meiotic failure leads to male and female sterility. Formation of gametes containing exact haploid genomes from which major chromosomal and gene mutations are filtered out is also critical for prevention of birth defects. To study the mechanisms of these surveillance mechanisms we analyze genetic control and mechanistic basis of laboratory models of chromosomal and genic hybrid sterility in mice. Here we report extensive asynapsis of chromosomes and disturbance of the sex body formation in >95 % of pachynemas of *Mus m. musculus* x *Mus m. domesticus* sterile F1 males. Asynapsis is not preceded by a failure of DSB induction and the rate of meiotic crossing over is not affected in synapsed chromosomes. DNA double-strand break repair is delayed or failed in unsynapsed autosomes and misexpression of Chr X and Chr Y genes occurs in early meiotic prophase. Oocytes of F1 hybrid females show the

same kind of synaptic problems but with the incidence reduced to half. Most of the oocytes with pachytene asynapsis are eliminated before birth. We report for the first time the heterospecific pairing of homologous chromosomes as a pre-existing condition of asynapsis in interspecific hybrids. The asynapsis may represent a universal mechanistic basis of F1 hybrid sterility manifested by pachytene arrest. It is tempting to speculate that a fast evolving subset of the noncoding genomic sequence important for chromosome pairing and synapsis may be the culprit.

Výstup byl připraven za podpory projektu OPVK CZ 1.07/2.3.00/20.0102 „Vytváření expertního týmu centra fenogenomiky“

### Literature

1. Homolka D, Ivanek R, Capkova J, Jansa P, Forejt J. Chromosomal rearrangement interferes with X-chromosome inactivation. *Genome Res.*, 2007; 17: 1431–1437.
2. Mihola O, Trachtulec Z, Vlcek C, Schimenti JC, Forejt J. A mouse speciation gene encodes a meiotic Histone H3 methyltransferase. *Science*, 2009; 323: 373–375.
3. Dzur-Gejdosova M, Simecek P, Gregorova S, Bhattacharyya T, Forejt J. Genetic architecture of hybrid sterility in the house mouse. *Evolution*, 2012; 66: 3321–3335. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01684.x.
4. Flachs P, Mihola O, Simecek P, Gregorova S, Schimenti JC, Matsui Y, Baudat F, de Massy B, Pialek J, Forejt J, Trachtulec Z. Interallelic and intergenic incompatibilities of the *Prdm9* (*Hst1*) gene in mouse hybrid sterility. *PLoS genetics* 8(11): e1003044.



Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



# Molekulární biologie kolorektálního karcinomu

čtvrtek / 29. listopadu 2012 / 15.30–16.45 hod.

## Charakteristiky MLH1 genu u pacientů se sporadicky se vyskytujícím kolorektálním karcinomem

Pavel Procházka<sup>1</sup>, Fabián Čaja<sup>2</sup>,  
 Michaela Schneiderová<sup>3</sup>, Peter Makovický<sup>4</sup>,  
 Lucie Schwarzová<sup>2</sup>, Ludovít Bielik<sup>1,2</sup>,  
 Miroslav Svoboda<sup>1</sup>, Ludmila Vodičková<sup>1,2</sup>,  
 Pavel Vodička<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.,  
 Praha

<sup>2</sup>Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK,  
 Praha

<sup>3</sup>I. chirurgická klinika, Všeobecná fakultní  
 nemocnice, Praha

<sup>4</sup>Fakulta agrobiologie, potravinových  
 a přírodních zdrojů, Česká zemědělská  
 univerzita, Praha

V České republice je kolorektální karcinom (CRC) velmi často se vyskytujícím nádorovým onemocněním. CRC se ve většině případů (90%) vyskytuje sporadicky a ve vyšším věku (>50 let). Přibližně 5–10% případů CRC zahrnuje dědičnou formu s možným časnějším výskytem (<45 let). Přibližně 20% ze sporadicky se vyskytujících CRC vykazuje nestabilitu mikrosatelitů, což jsou krátké repetitivní sekvence vyskytující se po celém lidském genomu. Změny v jejich délce mohou mít za následek aberantní transkripci významných genů (kódujících nádorové supresory nebo receptory pro růstové faktory). Nestabilitu mikrosatelitů způsobují defekty v opravách chybného párování bází řízených metylací (mismatch repair, MMR). Vysoká nestabilita mikrosatelitů je typická pro nádory pacientů s Lynch syndromem, kteří mají mutace v MMR genech (např. MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2). Tyto geny patří k významným tumor supresorovým genům nejen u CRC, ale i u řady dalších nádorů. K nestabilitě mikrosatelitů u CRC vedou i tzv. epimutace MLH1 (homolog MMR genu mutL u *E. coli*) představující epigenetickou inaktivaci prostřednictvím hypermetylace CpG ostrovů. Uvedené mechanismy se rovněž uplatňují při vzniku polypů ve sliznici tlustého střeva a jejich progresi přes adenomy až ke karcinomu.

Do naší studie jsme zahrnuli 99 DNA vzorků získaných od 96 pacientů se sporadickým CRC. Zaměřili jsme se na studium zárodečných i somatických variant v 19 exonech MLH1 genu

pomocí analýzy křivek tání s vysokým rozlišením (high resolution melting, HRM). Pozitivní vzorky s možným výskytem mutací byly následně ověřovány automatickým sekvenováním. Zároveň jsme zjišťovali hladinu metylace promotorové oblasti genu MLH1 pomocí HRM optimalizované pro detekci metylace (methylation-sensitive HRM, MS-HRM) a imunohistochemicky jsme stanovili expresi MLH1 proteinu.

V našem souboru pacientů jsme našli řadu variant MLH1 genu. Nejčastěji se vyskytující variantou byl polymorfismus c. 655 A>G, p. Ile219Val v exonu 8. Dále byly detekovány polymorfizmy v intronu 13 na pozici c. 1558+14 G>A (93 G/G, 6 G/A), v intronu 14 na pozici c. 1668–19 A>G (23 A/A, 56 A/G, 20 G/G), v exonu 17 c. 1959 G>T, p. Leu653Leu (94 G/G, 5 G/T) a v exonu 19 c. 2146 G>A, p. Val716Met (97 G/G, 2 G/A). Zcela nově jsme objevili dvě nové varianty, první v exonu 2 (zárodečná) na pozici c. 204 C>G, p. Ile68Met (98 C/C, 1 C/G) a druhou v exonu 11 (somatická) na pozici c. 973 C>T, p. Arg325Trp (98 C/C, 1 C/T). Vysoká nestabilita mikrosatelitů byla nalezena v 9 DNA vzorcích (8 pacientů). Ostatních 90 vzorků (88 pacientů) bylo určeno jako stabilních v mikrosatelitech. MS-HRM optimalizovaná pro detekci metylace na 1% hladině odhalila 15 vzorků CRC a 3 vzorky přilehlé zdravé tkáně s metylací vyšší než 1%. Při nastavení „cutoff“ na 25% (metylace 25–90%) jsme odhalili nádory CRC se silnou korelací mezi hypermetylací MLH1, vysokou nestabilitou mikrosatelitů a lokalizací ve slepém střevě (caecum) a vzestupném tračníku (colon ascendens). Snížení exprese MLH1 významně korelovalo nejen se zvýšenou hladinou metylace ( $R = -0,752$ ,  $p \leq 0,0000001$ ), ale i nižším stadiem onemocnění.

Na základě našich výsledků lze konstatovat, že somatické mutace v MLH1 genu v daném souboru pacientů hrají pravděpodobně minoritní roli ve vývoji sporadické formy CRC. Na druhou stranu hypermetylace MLH1 genu spojená s nižší expresí MLH1 má význam zejména pro počáteční stadia onemocnění, kdy nedostatečná funkčnost MMR bude pro progresi onemocnění klíčová. Nalezená metylace MLH1 genu ve zdravé tkáni naznačuje možné počínající prekancerózní změny, které ještě nejsou morfologicky zachytitelné.

Podpora: CZ: GA CR: GA P304/11/P715, CZ: GA CR: GA 304/12/1585 a IGA MZ CR NT 12025–4/2011.

## Okultní nádorové buňky u pacientů s kolorektálním karcinomem – negativní prognostický faktor

Josef Srovnal<sup>1</sup>, Andrea Benedíková<sup>1</sup>,  
 Kamil Vysloužil<sup>2</sup>, Pavel Skalický<sup>2</sup>,  
 Ivo Klementa<sup>2</sup>, Miloslav Duda<sup>2</sup>,  
 David Vrána<sup>3</sup>, Bohuslav Melichar<sup>3</sup>,  
 Karel Čwierka<sup>3</sup>, Věra Růžková<sup>1</sup>,  
 Lenka Radová<sup>1</sup>, Marián Hajdúch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř experimentální medicíny při  
 Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, Ústav  
 molekulární a translační medicíny

<sup>2</sup>I. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

<sup>3</sup>Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

**Úvod:** Detekce okultních nádorových buněk u solidních nádorů metodou RT-PCR v reálném čase je relativně novou metodou představující potencionálně účinný nástroj v klinické onkologii, který svým přínosem v oblasti ultrastagingu znamená zpřesnění diagnostiky. Cílem předkládané práce je objasnit prognostickou hodnotu přítomnosti okultních nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem.

**Metody:** Do studie bylo zařazeno 256 pacientů operovaných pro kolorektální karcinom. Metodou real-time RT-PCR byly na míru exprese carcinoembryonálního antigenu (CEA) a cytokeratinu 20 (CK20) vyšetřeny vzorky periferní krve a kostní dřeně v den operace a měsíc po operaci. Naměřené hodnoty exprese testovaných markerů byly korelovány s klinicko-patologickými charakteristikami a s parametry přežití.

**Výsledky:** Medián sledování souboru 191 pacientů s kolorektálním karcinomem klinického stadia I-III činil 62,5 měsíců, medián přežití 81,0 měsíců. Pozorovali jsme silnou závislost mezi přítomností okultních nádorových buněk a klinickým stadiem při využití Coxoví regresní analýzy. Pacienti s kolorektálním karcinomem a přítomností okultních nádorových buněk v periferní krvi při operaci za využití CEA jako markeru měli podstatně kratší celkové přežití ( $p < 0,06$ ,  $HR = 1,984$  (95% CI: 1,101–3,575)). Při využití markeru CK20 v kontrolních vzorcích krve měsíc po operaci měli pacienti s přítomností okultních nádorových buněk také kratší celkové přežití ( $p < 0,055$ ;  $HR = 1,857$  (95% CI: 1,005–3,432)). Obdobně bylo pozorováno výrazně kratší přežití také u pacientů s přítomností okultních nádorových buněk v kostní dřeni měsíc po operaci za využití markeru CEA ( $p < 0,02$ ,  $HR = 2,368$  (95% CI: 1,212–4,627)).



**Závěr:** Výsledky naší pokračující studie potvrzují, že přítomnost okultních nádorových buněk je negativním prognostickým faktorem u pacientů s kolorektálním karcinomem. Metodou PCR lze takto identifikovat pacienty s přítomností okultních nádorových buněk a kratším přežíváním, na které se může cíleně zaměřit adjuvantní terapie.

*Práce na tomto projektu je podporována granty MPOTIP FR-T11/525, IGA UP LF\_2012\_017 a CZ.1.05/2.1.00/01.0030.*

### Role miR-215 v patogenezi kolorektálního karcinomu

Petra Faltejsková<sup>1,2</sup>, Klára Šrůtová<sup>1</sup>,  
Jitka Mlčochová<sup>1</sup>, Marek Svoboda<sup>2</sup>,  
Rostislav Vyzula<sup>2</sup>, Ondřej Slabý<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CEITEC MU, Masarykova univerzita, Brno

<sup>2</sup>Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující molekuly jednořetězcové RNA, které posttranskripčně regulují genovou expresi. Svým působením ovlivňují řadu biologických dějů, jakými jsou diferenciace, apoptóza, buněčný cyklus, proliferace či metastázování. Početné studie prokázaly, že k deregulaci miRNA dochází u různých typů nádorových onemocnění včetně kolorektálního karcinomu (CRC), a tyto molekuly tak mohou působit jako nádorové supresory nebo naopak onkogeny. Přestože rozdílná exprese některých miRNA mezi nádorovou tkání a zdravou střevní sliznicí pacientů s CRC byla již opakovaně pozorována, jejich přesná úloha v patogenezi tohoto onemocnění nebyla dosud přesně popsána.

Hlavním cílem studie bylo popsat funkci miR-215 v patogenezi CRC, neboť deregulovaná exprese této miRNA byla již dříve zaznamenána na základě expresních profilů 667 miRNA metodou kvantitativní Real-Time PCR arrays u 63 důkladně klinicky charakterizovaných pacientů s CRC. Validace na nezávislém souboru 125 pacientů potvrdila významně nižší hladiny miR-215 ( $P < 0.0001$ ) v nádorové tkáni. Zároveň byla prokázána souvislost mezi sníženou hladinou této

miRNA a klinickým stadiem nemoci ( $P < 0,0001$ ), metastázováním do regionálních lymfatických uzlin ( $P < 0,0001$ ) či vyšším gradem ( $P = 0,0388$ ).

Pomocí in vitro analýz, kdy byla transfekována 10 nM pre-miR-215 do buněčných linií DLD-1 a HCT-116+/+, bylo zjištěno, že navýšení exprese této miRNA vede k poklesu ve viabilitě buněk HCT-116+/+ o  $21,7 \pm 0,3$  % ( $P = 0,05$ ) a DLD-1 o  $19,7 \pm 7,1$  % ( $P = 0,05$ ) 48 h po transfekci. Analýza buněčného cyklu dále prokázala, že miR-215 významně navyšuje podíl buněk v G0 G1 fázi a snižuje počet buněk v S fázi u buněčné linie HCT-116+/+ ( $P = 0,01$ ), nikoliv však u buněčné linie DLD-1. Podobně zvýšené hladiny miR-215 vedly k vzestupu v počtu apoptotických HCT-116+/+ buněk z  $14,6 \pm 2,1$  % na  $36,2 \pm 5,1$  % ( $P = 0,005$ ). Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s přítomností inaktivační mutace genu pro p53 u buněk DLD-1. Pomocí 'scratch wound assay' bylo dále zjištěno, že zvýšená exprese miR-215 snižuje migraci DLD-1 buněk o  $46,1 \pm 20,5$  % ( $P = 0,05$ ) a HCT-116+/+ buněk o  $26,6 \pm 35,2$  % ( $P > 0,05$ ).

Snížená exprese miR-215 byla již pozorována u řady nádorových onemocnění a lze tedy předpokládat, že funguje jako nádorový supresor. Výsledky této studie dále naznačují případné využití miR-215 jako nového biomarkeru u CRC a funkční screening potvrdil, že představuje potenciálně cíl při léčbě tohoto onemocnění. Přesné molekulární mechanismy její funkce však nejsou dosud známy a bude jim porozuměno teprve v případě, že se podaří identifikovat a experimentálně validovat cílové molekuly této zajímavé miRNA.

*Práce byla podpořena grantem IGA MZČR NT13549-4/2012 a NT13860 4/2012, projektem CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) a výzkumným záměrem MZMOMOU2005.*

### Význam dlouhých nekódujících RNA u nádorových onemocnění

Jiří Šána<sup>1,2</sup>, Petra Faltejsková<sup>1,2</sup>,  
Simona Hankeová<sup>1</sup>, Marek Svoboda<sup>1,2</sup>,  
Rostislav Vyzula<sup>1</sup>, Ondřej Slabý<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno

Většinu eukaryotického genomu představují DNA sekvence, které nekódují proteiny. Tyto sekvence jsou přepisovány buď podle vývojového programu daného organismu, nebo v rámci odpovědi na vnější signály. Výsledkem transkripce takových sekvencí je pak velké množství dlouhých nekódujících RNA (lncRNA). Celogenomové studie předpokládají existenci více než 3 300 lncRNA. Dlouhé nekódující RNA jsou definovány jako molekuly nekódujících RNA o délce více než 200 nukleotidů. Ačkoli bylo dosud funkčně charakterizováno pouze omezené množství lncRNA, jejich regulační potenciál je již dnes evidentní. lncRNA hrají klíčové role jak v transkripčních, tak v posttranskripčních regulačních drahách. U mnoha nádorových onemocnění dochází k deregulaci lncRNA, což společně s jejich funkčními vlastnostmi naznačuje jejich potenciál v procesech maligní transformace.

Jednou ze tříd lncRNA jsou přepisované vysoce konzervované oblasti (transcribed-ultraconserved regions; T-UCR) vyznačující se vysokou homologií mezi ortologními oblastmi lidského, potkaního a myšího genomu. V současné době je známo 481 takových sekvencí. Z funkčního hlediska se T-UCR jeví jako inhibitory proteinkódujících genů a některých nekódujících RNA, včetně mikroRNA. Nedávné studie naznačily, že exprese T-UCR je u vybraných nádorových onemocnění deregulována a dokonce koreluje s klinicko-patologickými charakteristikami pacientů. Naše sdělení bude zaměřeno na současné poznatky z oblasti zapojení lncRNA do biologie nádorových onemocnění včetně prezentace výsledků naší práce zaměřené na studium T-UCR u kolorektálního karcinomu.

*Tato práce byla podpořena granty Interní Grantové Agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky NT13514-4/2012 a NT11214-4/2010; projektem "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068); a Institucionálními zdroji pro Podporu výzkumných organizací poskytnutou Ministerstvem zdravotnictví České republiky v roce 2012.*

# Nádorové biomarkery I

čtvrtek / 29. listopadu 2012 / 17.00–18.45 hod.

## Nové trendy ve výzkumu mikroRNA u solidních nádorů

Ondřej Slabý<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

<sup>2</sup>CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA dlouhé 18–25 nukleotidů, které post-transkripčně regulují genovou expresi v průběhu rozličných buněčných procesů, jako jsou apoptóza nebo diferenciacie, ale i maligní transformace. Změny v expresních profilech miRNA již byly pozorovány u většiny solidních nádorů. Mechanistické studie v nádorové buňce prokázaly schopnost jednotlivých miRNA vykazovat funkci nádorových supresorů a onkogenů. Nejnovější pozorování navíc popisují potenciál jedné miRNA vykazovat v závislosti na kontextu jak funkci nádorového supresoru, tak onkogenu. Tato pozorování zásadním způsobem rozšířila koncept molekulární patogeneze nádorových onemocnění a naznačila potenciál miRNA nejen jako diagnostických biomarkerů, ale také jako potenciálních terapeutických cílů. Specifické expresní profily miRNA byly u pacientů se solidními nádory úspěšně využity ke stanovení prognózy, k predikci léčebné odpovědi na vybrané terapeutické režimy nebo upřesnění diagnostiky u metastáz neznámého původu. Přítomnost miRNA byla prokázána v krevním séru a plazmě, ale také moči nebo mozkomíšním moku, kde vykazovaly nejen vysokou míru stability, ale u vybraných solidních nádorů rovněž velice dobré analytické vlastnosti. V současné době je kromě možného diagnostického využití cirkulujících miRNA intenzivně studován jejich původ a příčiny jejich extrémně vysoké stability. MiRNA jsou také velice slibnými terapeutickými cíli, přičemž první protinádorová terapie na bázi miRNA vstupuje do klinického hodnocení začátkem příštího roku. Sdělení zahrnuje novinky z oblasti biogeneze a funkce miRNA, izomiRs, koncept kompetujících endogenních RNA (ceRNAs), význam miRNA v nádorové biologii a jejich zapojení do hlavních znaků maligního nádoru, biologie nádorové kmenové buňky či autofagie. V kontextu našich výsledků bude diskutována schopnost vybraných miRNA sloužit jako tkáňové biomarkery (prognostické a prediktivní), sérové a močové biomarkery

(diagnostické) a potenciální terapeutické cíle u kolorektálního karcinomu, renálního karcinomu a glioblastomu.

*Výzkum byl podpořen granty IGA MZ ČR NT13549–4/2012, NT13860 4/2012, NT-13547-04/2012, NT13514–4/2012 a NT11214–4/2010.*

## Možnosti vyšetření genu Her-2 u pacientů s karcinomem prsu

Vladimíra Koudelaková<sup>1</sup>, Jitka Berkovcová<sup>1</sup>, Radek Trojanec<sup>1</sup>, Lenka Radová<sup>1</sup>, Jiří Ehrmann<sup>2</sup>, Zdeněk Kolář<sup>2</sup>, Dana Cahová<sup>1</sup>, Bohuslav Melichar<sup>3</sup>, Marián Hajdúch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

<sup>3</sup>Department of Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

Vyšetření genu her-2 je nedílnou součástí rutinní diagnostiky pacientů s karcinomem prsu, které je nezbytné pro indikaci biologické léčby trastuzumabem. Běžnou praxí je skriningové vyšetření overexpresie her-2 proteinu pomocí imunohistochemie a následná verifikace hraničně pozitivních či nejasných výsledků fluorescenční in situ hybridizací (FISH), která identifikuje počet kopií genu her-2. Přibližně u 5 % pacientů není možné vyšetření FISH hodnotit, příčinou obtížné hybridizace je nejčastěji špatná kvalita DNA způsobená nesprávnou manipulací se vzorkem, nejčastěji špatnou fixací preparátu. Pro vzorky, u nichž není možné vyšetření FISH kvalitně zhodnotit, byla v naší laboratoři zavedena metodika 3 duplexních real-time PCR (qPCR). Tyto PCR reakce porovnávají počet kopií genu her-2 s třemi referenčními geny gcs-1, dck, epn2, lokalizovanými na chromozomech 2, 4 a 17. Metoda je schopná zachytit pozitivitu při 5% obsahu DNA s vysokým počtem kopií her-2 genu. Metoda byla validována na sérii 181 patientských vzorků, které byly paralelně vyšetřeny pomocí IHC (HercepTest), FISH (PathVysion) a qPCR. Senzitivita metody byla 97,8 %, resp. 94,6 % při porovnání qPCR s FISH, resp. IHC. Specifita metody byla 100 %, resp. 98,5 % při porovnání

qPCR s FISH, resp. IHC. K dnešnímu bylo vyšetřeno 198 vzorků karcinomu prsu, u nichž nebylo možné stanovit počet kopií genu her-2 pomocí FISH. Pomocí qPCR bylo možné her-2 status stanovit u 69,2 % z nich, u 30/198 pacientů (15,2 %) byla nalezena amplifikace her-2, u 54 % (107/198) byl nalezen fyziologický status her-2 genu. Stanovení počtu kopií genu her-2 pomocí qPCR je dostatečně citlivá a specifická metoda, která se zdá být velmi důležitá v diagnostice karcinomu prsu, a to především u vzorků, u nichž selhala metoda FISH.

*Tato práce je podpořena granty GAČR 303/09/H048, IGA LF\_2012\_017 a BIOMEDREG CZ.1.05/2.1.00/01.0030.*

## Biopsia SLU u vybraných pacientok s duktálním karcinómem in situ – kazuistika

Marta Marcinová, Andrej Vrzgula, Sylvia Krajníková

III. chirurgická klinika SZU – I. Súkromná nemocnica, a.s.; Nemocnica Košice – Šaca

**Úvod:** SLNB je miniinvazívna a presná metóda hodnotiaca postihnutie axilárnych lymfatických uzlín u pacientok s invazívnym karcinómom prsníka. Technika SLNB bola úspešne aplikovaná aj u pacientok premenopauzálnych vekových kategórií s CCB vyšetrením verifikovaným DCIS.

**Materiál a metodika:** Kazuistika 40 r. pacientky (s pozitívnou rodinnou anamnézou, po dvoch pôrodoch, užívajúca päť rokov hormonálnu antikoncepciu), s klinicky verifikovaným tumorom prsníka TINOM0, CCB vyšetrením hodnoteným ako DCIS.

**Výsledok:** Lymfoscintigrafickým vyšetrením bola zobrazená jedna sentinelová lymfatická uzlina lokalizovaná v axilárnej oblasti. Histopatologickým vyšetrením SLU nebola potvrdená mikroinvázia ani MTS postihnutie. Preto bola dokončená len prsník zachovná operácia – quadrantektómia s peroperačnou rýchlou histológiou (bez známok infiltrácie chirurgických resekcčných okrajov, potvrdená prítomnosť invazívnych ložísk). Výsledky definitívneho histopatologického vyšetrenia preukázali prítomnosť komponent duktálneho invazívneho karcinómu, grade 1, low nuclear grade, proliferatívny index Ki-67 score 10 %, pozitívnou expresiou steroidných receptorov, prítomno-

sťou intraduktálních papilómů v okolitom peritumorálním tkanive, typickou a atypickou duktální hyperpláziou.

**Záver:** Úloha SLNB u CCB verifikovaného DCIS prsníka zostáva neustále predmetom kontroverzných diskusií. Percento metastatického axilárneho postihnutia u pacientok s DCIS je nízke (1,7 %). V prípade potvrdenia metastatického postihnutia SLU ev. nález mikrometastáz, je nevyhnuté doplniť disekciu axilárnych LU I. a II. stáží – predovšetkým u premenopauzálnych pacientok. Dôsledné a definitívne histologické vyšetrenie resekátu prsníka s primárnym ložiskom je nevhnutné za účelom vylúčenia prítomnosti mikroinvazívnych ložísk – zodpovedných za metastatické postihnutie axilárnych lymfatických uzlín. Významnú úlohu zohráva aj hodnotenie biologických vlastností nádorovej lézie: veľkosť primárnej TU lézie, gradýing, histologický subtyp, difúzne alebo multicentrické mikrokalcifikácie, status steroidných hormonálnych receptorov, proliferačný index; v súlade s hodnotením onkochirurgickej radikality a menopauzálného statusu; ktoré ovplyvňujú riziko metastatického posthnutia. Vzhľadom na vysoký výskyt invazívnych zložiek v definitívnom histopatologikom hodnotení primárnej nádorovej lézie prsnej žľazy (predoperačne CCB hodnoteným ako DCIS) by tieto pacientky predovšetkým v premenopauzálnom veku mali štandardne podstúpiť lymfoscintigrafické vyšetrenie s následnou SLNB a quadrantekómiou v jednom sedení. SLNB môžeme považovať za štandardnú rutinnú metódu v terapii premenopauzálnych pacientok s DCIS.

### **Polyzómie chromozomu 17 u olomouckého souboru pacientek s karcinomem prsu**

Radek Trojanec, Magdalena Knebllová, Vladimír Koudeláková, Soňa Mlčochová, Marián Hajdúch

Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc

U karcinomu prsu bývá zároveň s genem Her-2/neu (H) vyšetřován i status chromozomu 17 (CH17). Poměr počtu kopií H/CH17 je důležitým kritériem pro stanovení amplifikace genu. Počet kopií CH 17 (polyzómie/monozómie) bývá nejčastěji vyšetřován pomocí alfa-satelitní (centromerické) sondy, CEP17. Jak však bylo popsáno, CEP 17 nemusí ve všech případech hybridizovat s dostatečnou specifitou, a tudíž

odečtené signály nekorrespondují s reálným počtem CH17.

V rámci olomouckého souboru pacientek s karcinomem prsu bylo na počátku roku 2012 vyšetřeno 3 531 pacientek (v současné době probíhá analýza souboru za rok 2012). U 8,52 % (301/3531) pacientek byla nalezena polyzómie chromozomu 17.

Zvýšený počet kopií CH17 (CH17 > 2,5) byl potvrzen pouze u 22,4 % (56/250) původně „polyzómických“ pacientek. U 51 případů (20,4 %) došlo díky zpřesnění poměru H/CH17 k přeřazení z kategorie „neamplifikovaný gen Her-2/neu“ do kategorie „amplifikovaný“, neboť bylo splněno kritérium H/CH17 > 2,2, tj. pacientky byly nově indikovány k léčbě trastuzumabem (Herceptin).

V současné době se snažíme získat klinické údaje o účinnosti Herceptinu u těchto pacientek a poukázat tím na nezbytnost zpřesnění polyzómie chromozomu 17, detekované centromerickou sondou.

*Poděkování za podporu patří projektu Biomedreg CZ.1.05/2.1.00/01.0030.*

### **Primární řasinky buněk gastrointestinálních stromálních tumorů**

Josef Dvořák<sup>1</sup>, Veronika Sitorová<sup>2</sup>, Dimitar Hadži Nikolov<sup>2</sup>, Aleš Ryška<sup>2</sup>, Bohuslav Melichar<sup>3</sup>, Igor Richter<sup>4,5</sup>, David Buka<sup>1</sup>, Jaroslav Mokřý<sup>6</sup>, Stanislav Filip<sup>1</sup>, Jiří Petera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika onkologie a radioterapie LF UK a FN Hradec Králové

<sup>2</sup>Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN Hradec Králové

<sup>3</sup>Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

<sup>4</sup>Oddělení klinické onkologie, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

<sup>5</sup>LF UK Hradec Králové

<sup>6</sup>Ústav histologie a embryologie LF UK Hradec Králové

**Východiska a cíl:** Primární řasinka je senzorická, solitární, nepohyblivá, mikrotubulární struktura, která se v klidové části buněčného cyklu nachází na povrchu většiny lidských buněk, včetně buněk stromatu nádorů. Na povrchu buněk většiny typů karcinomů se primární řasinky nevyskytují. Přítomnost primární řasinky na povrchu buňky je přechodná: vyskytuje se v klidové fázi G1 (G0) a na počátku S fáze buněčného cyklu, před vstupem nebo v průběhu G2 fáze buněčného cyklu se resorbuje.

Po ukončení mitózy centrosom (oba centrioly s pericentriolárním materiálem) migruje k povrchu buňky, kde se mateřský centriol diferencuje v bazální tělísko, které slouží jako nukleární centrum mikrotubulů axonematu primární řasinky. Po většinu doby interfáze je centrosom lokalizován při povrchu buňky pod buněčnou membránou, kde jeho mateřský centriol, dočasně diferencovaný na bazální tělísko, slouží jako nukleární centrum mikrotubulů axonematu senzorické primární řasinky. Před zahájením mitózy se mikrotubuly primární řasinky depolymerizují. (Tím se uvolní bazální tělísko mateřský centriol a centrosom se může přemístit k jádru buňky, aby mohla být zahájena mitóza). V primárních řasinkách různých typů buněk jsou přítomny různé typy receptorů, a jsou v nich aktivní některé signální dráhy. Poruchy tvorby, struktury, nebo funkcí primárních řasinek se studují u řady onemocnění a vývojových vad.

Z literatury je známo, že se primární řasinky vyskytují na povrchu Cajalových intersticiálních buněk, které jsou považovány za prekurzorové buňky gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST). V literatuře však není informace o tom, zda jsou primární řasinky přítomny na povrchu buněk GISTů. Cílem této pilotní studie je zjistit, zda se na povrchu buněk GISTů vyskytují primární řasinky, a pokud ano, tak v jaké frekvenci.

**Pacienti a metodika:** Přítomnost primárních řasinek byla hodnocena u 9 pacientů s GISTy, včetně 8 primárních nádorů a 1 metastázy jater. U 2 pacientů byla přítomnost primárních řasinek hodnocena nejen v primárním nádoru, ale i v recidivě: u 1 pacienta v recidivě bez předchozí léčby imatinibem a u 1 pacienta v recidivě po předchozí léčbě imatinibem. Primární řasinky byly barveny červeně značenou protilátkou proti acetylovanému alfa tubulinu, jádra buněk byla barvena modře (DAPI). Frekvence primárních řasinek byla hodnocena jako poměr počtu jader a primárních řasinek buněk GISTů.

**Výsledky:** Celkem bylo pozorováno 9985 jader a 425 primárních řasinek buněk GISTů. Medián frekvence výskytu primárních řasinek buněk všech vyšetřených GISTů činil 4,26 %, primárních nádorů 4,32 % a metastáz 3,64 %.

**Závěr:** Tato pilotní studie poprvé prokázala přítomnost primárních řasinek na povrchu buněk GISTů. Primární řasinky byly pozorovány ve všech vyšetřených GISTech, včetně primárních nádorů, metastáz a recidiv bez předchozí léčby imatinibem, i po předchozí léčbě imatinibem.

*Poděkování: Práce byla podpořena projektem PRVOUK P37/06.*

## Nádorové biomarkery II

pátek / 30. listopadu 2012 / 9.00–11.00 hod.

### MikroRNA jako diagnostické a prognostické biomarkery renálního karcinomu

Renata Héžová<sup>1,2</sup>, Martina Rádová<sup>1,2</sup>, Robert Iliev<sup>1</sup>, Alexandr Poprach<sup>2</sup>, Jana Nekvindová<sup>3</sup>, Radek Lakomý<sup>2</sup>, Pavel Fabian<sup>2</sup>, Lenka Radová<sup>4</sup>, Marek Svoboda<sup>2</sup>, Jan Doležel<sup>2</sup>, Rostislav Vyzula<sup>2</sup>, Ondřej Slabý<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno

<sup>2</sup>Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>3</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK v Hradci Králové a FN v Hradci Králové

<sup>4</sup>Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc

Renální karcinom (RCC) představuje cca 3 % všech solidních nádorů v dospělém věku s incidencí 29 případů na 100 000 obyvatel v ČR. MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA se schopností post-transkripčně regulovat genovou expresi více než 2/3 lidských genů včetně onkogenů či nádorových supresorů. Prvním cílem naší studie bylo identifikovat tkáňové miRNA s prognostickým významem, které by umožnily nalézt pacienty s vysokým rizikem relapsu po nefrektomii. Na základě expresního profilování založeného na principu qRT-PCR (TLDA) jsme na souboru 31 pacientů identifikovali 64 miRNA, pomocí kterých bylo možné odlišit pacienty se špatnou prognózou ( $p < 0.05$ ): 20 miRNA vykazovalo zvýšenou expresi a 44 miRNA naopak sníženou expresi. Následně jsme na nezávislém souboru 46 pacientů validovali 9 vybraných miRNA (miR-409–3p, miR-127–3p, miR-143, miR-26a, miR-145, miR-10b, miR-136\*, miR-195 a miR-126), přičemž u 6 jsme potvrdili sníženou hladinu u pacientů s horší prognózou. Pomocí Kaplan-Meierovy analýzy a long-rank testu jsme prokázali signifikantní korelaci mezi miR-127–3p ( $p = 0.014$ ), miR-145 ( $p = 0.05$ ) a miR-126 ( $p = 0.015$ ) a přežíváním bez relapsu. Druhým cílem bylo identifikovat sérové biomarkery umožňující diagnostiku pacientů s RCC. Pomocí expresního profilování (TLDA) jsme identifikovali 30 miRNA, které byly rozdílně exprimované v séru pacientů s RCC a zdravých dárců. Na nezávislém souboru pacientů ( $n = 90$ ) a zdravých dárců ( $n = 35$ ) jsme potvrdili zvýšenou hladinu miR-378 ( $p = 0,0003$ ,  $AUC = 0,71$ ) a sníženou hladinu miR-451 ( $p < 0,0001$ ,  $AUC = 0,77$ ) v krevním séru pacientů s RCC.

Kombinace těchto 2 miRNA umožnila identifikovat sérum pacientů s RCC s 83% senzitivitou při 81% specifitě a AUC 0,86. Po dalších nezávislých validacích by nalezené tkáňové miRNA mohly být používány pro predikci časného relapsu po nefrektomii v klinické praxi, a tím by mohly přispět k individualizaci terapie pacientů s RCC. Cirkulující sérové miRNA se zase zdají být slibnými diagnostickými biomarkery RCC.

*Práce byla podpořena grantem IGA MZ NT-13547-04/2012.*

### Analýza mutace p.Val600Glu genu BRAF u pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy

Jiří Drábek<sup>3</sup>, Jindřich Lukáš<sup>1,2</sup>, Bohumil Dudašek<sup>4</sup>, Petr Važan<sup>5</sup>, Jana Stránská<sup>3</sup>, Sylwia Jančík<sup>3</sup>, Markéta Macková<sup>6</sup>, Martin Syruček<sup>7</sup>, David Lukáš<sup>8</sup>, Pavel Dundr<sup>9</sup>, Bára Hintnausová<sup>10</sup>, Jaromír Astl<sup>1</sup>, Miroslava Rabčanová<sup>3</sup>, Veronika Holinková<sup>3</sup>, Marián Hajdúch<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Oddělení ORL a chirurgie hlavy a krku Nemocnice Na Homolce, Praha

<sup>2</sup>Otorinolaryngologická klinika LF UK a FN v Plzni

<sup>3</sup>Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP v Olomouci a FN Olomouci

<sup>4</sup>Chirurgické oddělení Nemocnice Atlas a.s. Zlín

<sup>5</sup>Bioptická a cytologická laboratoř J. A. Bati, Zlín

<sup>6</sup>Klinika nukleární medicíny a endokrinologie 2. LF UK v Praze a FN Motol, Praha

<sup>7</sup>Oddělení patologie Nemocnice Na Homolce, Praha

<sup>8</sup>Chirurgická klinika 3. LF UK a FNKV, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10

<sup>9</sup>Ústav patologie, 1 LF UK v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

<sup>10</sup>Interní oddělení-endokrinologická ambulance Nemocnice Na Homolce, Praha

**Úvod:** Nejčastější histologickou variantou diferencovaného karcinomu štítné žlázy je PTC (papillary thyroid carcinoma). Aktivující bodová mutace p.Val600Glu genu BRAF, byla u PTC asociována se špatnou prognózou. Naším cílem bylo korelovat klinickopatologické parametry s výsledky vyšetření mutačního statusu genu BRAF u pacientů s PTC, sledovat případné rozdíly

v mutačním statusu u subtypů PTC, u primárního nádoru a metastáz a u jednotlivých fokusů u multifokálních tumorů.

**Metody:** Retrospektivní analýza 324 papilárních nádorů štítné žlázy a metastáz v krčních uzlinách pocházejících od 154 pacientů operovaných ve dvou českých centrech v období od roku 2003 do roku 2012. Izolace byla provedena DNA soupravou DNeasy Blood and Tissue (QiaGen, Hilden, Německo), genotypizace mutace p.Val600Glu genu BRAF byla provedena dvoubarevným qPCR systémem s hydrolyzační sondou (IntelliMed, ČR).

**Výsledky:** Analyzovatelná DNA byla získána ze 145 patientských vzorků. Nejmenší úspěšnost extrakce DNA byla u folikulární varianty PTC. U multifokálních nádorů byl v několika případech nalezen rozdíl v mutačním statusu mezi ložisky (n.s.). Mutace BRAFV600E byla detekována u 84 případů (57,9 %). Potvrdili jsme asociaci mezi BRAF V600E mutací a přítomností metastáz do krčních uzlin ( $p = 0,028$ ). Papilární varianta PTC vykazovala častější BRAFV600E mutace než jiné subtypy PTC (0,046).

*Poděkování: projekt byl proveden za přispění grantu MPO TIP FR-T11/525 a CZ.1.05/2.1.00/01.0030).*

### Prognostický význam minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem plic

Andrea Benedíková<sup>1</sup>, Josef Srovnal<sup>1</sup>, Jiří Klein<sup>2</sup>, Pavel Skalický<sup>2</sup>, Marek Szkorupa<sup>2</sup>, Dana Mlčůchová<sup>1</sup>, Marián Hajdúch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc

<sup>2</sup>Chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

**Úvod:** Karcinom plic je v České republice jedním z nejčastějších nádorových onemocnění (incidence u mužů 51,14/100 000, u žen 17,07/100 000). I přes obrovský pokrok v léčbě onkologických malignit zůstává mortalita stále vysoká (u mužů 43,98/100 000, u žen 12,73/100 000) (2009, www.svod.cz). Minimální reziduální chorobou (MRD) u nemocných pacientů s karcinomem plic rozumíme přítomnost izolovaných nádorových buněk v těle pacienta, u něhož byl odstraněn primární tumor a který je v současnosti bez klinických známek onemocnění. Tyto izolované nádorové buňky lze na základě současných znalostí považovat za prekursor



mikrometastáz. Detekce MRD u pacientů s karcinomem plic by mohla přispět ke zpřesnění prognózy onemocnění a k eliminaci zatěžujícího chirurgického výkonu u nemocných se systémovou molekulární diseminací nemoci.

**Metody:** Do prospektivní studie bylo zařazeno 108 pacientů (75 mužů, 33 žen, průměrný věk 66,2 let) operovaných s kurativním záměrem pro karcinom plic. Metodou real-time RT-PCR byly na míru exprese karcinoembryonálního antigenu (CEA), receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), lung-specific X proteinu (LUNX) a receptoru pro hepatocytární růstový faktor (c-met) vyšetřeny vzorky kostní dřeně, periferní krve, krve z plicní žíly a tumoru. Naměřené hodnoty exprese testovaných markerů byly korelovány s klinicko-patologickými charakteristikami a s parametry přežití.

**Výsledky:** Zaznamenali jsme statisticky významnou závislost mezi mírou exprese c-met v krvi z plicní žíly a klinickým stadiem ( $p < 0,044$ ) a postižením lymfatických uzlin ( $p < 0,0023$ ). Významně vyšší byla také pozitivita c-met v periferní krvi ( $p < 0,034$ ) a v krvi z plicní žíly ( $p < 0,04$ ) u pacientů s postižením lymfatických uzlin na rozdíl od pacientů s histologicky negativními uzlinami.

82 pacientů s karcinomem plic sledovaně po dobu delší než 1 rok jsme zahrnuli do analýzy celkového přežití. 27 z nich (32,9 %) zemřelo, medián celkového přežití byl 19,8 měsíce. Pacienti s pozitivitou c-met v periferní krvi nebo kostní dřeni vykazovali signifikantně kratší celkové přežívání ( $p < 0,024$ ; HR=4.39 (95 % CI: 1.58–12.22), resp.  $p < 0,008$ ; HR=5.08 (95 % CI: 1.79–14.43)). Statisticky významně kratší celkové přežívání jsme pozorovali u pacientů s pozitivitou CEA a/nebo c-met v kostní dřeni ( $p < 0,025$ ; HR=3.08 (95 % CI: 1.26–7.5)).

**Závěr:** Výsledky naší studie dokazují negativní prognostický význam přítomnosti minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem plic. Prokázali jsme závislost markeru c-met na klinickém stadiu onemocnění. Pomocí markerů c-met a CEA jsme identifikovali pacienty s kratším celkovým přežíváním. Detekce přítomnosti MRD zůstává využitelným a reprodukovatelným vyšetřením přispívajícím k individualizaci terapie.

*Práce na tomto projektu je podporována granty CZ1.05/2.1.00/01.0030 and IGA UP LF\_2012\_017.*

### Genetický polymorfismus vybraných reparačních genů báze excízní reparační karcinogenéze plic

Lucia Letková, Tatiana Matáková, Ludovít Mušák, Martina Krutáková,

Petra Slováková, Miroslava Šarlinová,

Anna Drgová, Erika Halašová

Ústav lékařské biologie, Jesseniova lékařská fakulta UK, Martin

Na Slovensku je každoročne diagnostikovaných viac ako 2000 nových prípadov pľúcnych malignít. Hoci má v posledných rokoch celková incidencia karcinómu pľúc u mužov mierne klesajúcu tendenciu, u žien neustále stúpa, pričom je hlavnou z príčin úmrtia na onkologické ochorenia. Do popredia onkologického výskumu sa dostáva hľadanie nových diagnostických metód na včasnú identifikáciu ochorenia a vyselektovanie rizikových jedincov. Jednou z potenciálnych možností je štúdium genetického polymorfizmu a mutácií génov, ktoré sa zúčastňujú na regulácii rastu buniek, na metabolizme xenobiótik exogénneho a endogénneho pôvodu a génov podieľajúcich sa na oprave poškodenej DNA. Znížená reparačná schopnosť DNA je spojená so zvýšenou náchylnosťou bunky a organizmu na rozvoj nádorového ochorenia.

Naša práca sa zameriava na sledovanie polymorfizmov vybraných DNA reparačných genov: hOGG1 Ser326Cys a XRCC1 Arg399Gln s dôrazom na medzipohlavné rozdiely. Do štúdie bolo zaradených 357 pacientov s diagnostikovaným karcinómom pľúc (271 mužov, 86 žien) a 379 zdanlivo zdravých jedincov (226 mužov, 153 žien) ako kontrolná skupina. Determinácia genotypov bola uskutočnená metódou PCR-RFLP. Rozdiely v distribúcii jednotlivých genotypov a ich kombinácii boli vyhodnotené použitím chí-kvadrát test ( $\chi^2$ ). Na výpočet rizika genotypových variant daných polymorfizmov vo vzťahu k nádorovému ochoreniu pľúc sa použil Odds ratio (OR) a 95% konfidenčný interval (95% CI).

U génu XRCC1 sme zaznamenali štatistickú významnosť u jedincov s variantnou alelou Gln399, ktorá mala 1,69-násobne vyššiu frekvenciu ( $p = 0,0004$ ) u žien s karcinómom pľúc v porovnaní so ženami v kontrolnej skupine. Pri analýze jednotlivých genotypov sme zistili signifikantne zvýšené riziko rozvoja karcinómu pľúc v skupine žien v prípade polymorfizmu génu XRCC1 v heterozygotnom genotype Arg399Gln (OR = 2,19,  $p = 0,007$ ) a variantnom genotype Gln399Gln (OR = 2,61,  $p = 0,03$ ). Pri sledovaní jednotlivých kombinácií genotypov sa v súbore žien ako rizikovejšie identifikovali nasledovné kombinácie: XRCC1 Arg/Arg + hOGG1 Ser/Cys (OR = 2,64,  $p = 0,04$ ), XRCC1 Arg/Gln + hOGG1 Ser/Ser (OR = 3,05,  $p = 0,003$ ), XRCC1 Arg/Gln + hOGG1 Cys/Cys (OR = 5,45,  $p = 0,04$ ), XRCC1 Gln/Gln + hOGG1 Ser/Ser (OR = 6,81,  $p = 0,0013$ ).

Na základe našich výsledkov môžeme potvrdiť hypotézu, že genetický polymorfizmus génov báze excízní reparačie hOGG1 a XRCC1 pravdepodobne zohráva úlohu v karcinogenéze pľúc, pričom naša práca ako prvá poukazuje na pohlavné rozdiely v súvislosti s rizikom vzniku a rozvoja karcinómu pľúc a genetickými polymorfizmami vybraných DNA reparačných genov.

*Grantová podpora: APVV-04012-11 a Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení – ITMS 26220220153.*

### Raritní případ současného výskytu dvou mutací genu EGFR u pacienta s NSCLC z hlediska laboratorní diagnostiky

Blanka Robešová<sup>1</sup>, Monika Bajerová<sup>1</sup>, Jana Skříčková<sup>2</sup>, Marcela Tomíšková<sup>2</sup>, Jitka Hausnerová<sup>3</sup>, Mojmír Moulis<sup>3</sup>, Dana Dvořáková<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Interní hematologická a onkologická klinika, Centrum molekulární biologie a genové terapie, FN Brno a LF MU Brno

<sup>2</sup>Klinika nemocí plicních a tuberkulózy, FN Brno

<sup>3</sup>Ústav patologie, FN Brno, 4CEITEC-MU Brno

**Úvod:** Analýza mutačního stavu genu EGFR je prováděna u pacientů s NSCLC vzhledem k indikaci cílené léčby tyrozinkinázovými inhibitory genu EGFR (EGFR-TKI). Aktivační mutace se vyskytují z 90 % v exonech 19 a 21. Výskyt mutací navozující rezistenci na terapii EGFR-TKI je minimální (do 5 %), nejčastěji se jedná o bodovou mutaci T790M v exonu 20 genu EGFR. Současný výskyt dvou typů mutací EGFR je v literatuře uváděn, sekundární výskyt mutace T790M se objevuje u pacientů s rezistencí k terapii EGFR-TKI.

**Cíl:** Prezentace případu výskytu dvou mutací EGFR ve vzorcích pacienta s NSCLC; porovnání výsledků získaných několika molekulárně biologickými metodami.

**Metody:** Vyšetřovány byly vzorky DNA z fixované nádorové tkáně (FFPE), cytologického nátěru a z periferní krve. U FFPE a cytologického nátěru byla provedena histologická analýza včetně stanovení podílu nádorové tkáně. DNA byla z FFPE izolována pomocí DNA Sample Preparation Kit (Roche), z cytologického nátěru soupravou QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) a z periferní krve soupravou QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Pro mutační analýzu genu EGFR byly použity metody: fragmentační analýza s hladinou senzitivity 5 % (exon 19), přímá sekvenace s limitem 25 % (bodová mutace exon 20)



a 10 % (delece exon 19), Cobas EGFR Mutation Test (Roche) s limitem 5 % (43 mutací v exonech 18–21), PNAclamp EGFR Mutation Detection Kit (Panagene) s detekčním limitem 2,5 % (29 mutací v exonech 18–21), mutant-enriched PCR s citlivostí 0,05 % (delece exon 19).

**Výsledky:** Byla provedena mutační analýza genu EGFR u vzorku DNA z cytologického preparátu pacienta léčeného EGFR-TKI s progresí NSCLC. Vyšetřena byla oblast exonu 19 a 21, v exonu 19 byla detekována delece. Pro potvrzení tohoto výsledku byla použita diagnostická souprava PNAclamp EGFR Mutation Detection Kit. Ta potvrdila přítomnost delece v exonu 19 a současně detekovala ve vzorku další typ mutace (T790M). Identický výsledek byl prokázán i diagnostickou soupravou Cobas EGFR Mutation Test. Následně byl vyšetřen vzorek FFPE ze stejného období a vzorek periferní krve. Ve vzorku FFPE byl opět prokázán současný výskyt delece v exonu 19 a T790M. Ve vzorcích periferní krve se nepodařilo standardními metodami prokázat žádnou mutaci genu EGFR, metoda mutant-enriched PCR detekovala přítomnost delece v exonu 19. Retrospektivně byl standardními diagnostickými metodami včetně diagnostických souprav vyšetřen záchytový FFPE materiál, ve kterém byla detekována pouze delece v exonu 19.

**Souhrn:** U pacienta s progresí onemocnění byla prokázána přítomnost dvou typů mutace genu EGFR, aktivační mutace (delece exon 19) a mutace navozující rezistenci k cílené terapii TKI (T790M exon 20). U vstupního odběru této pacienta byla zachycena pouze aktivační mutace (delece exon 19). Pacient byl po záchytu léčen dvěma cykly chemoterapie (1. cyklus – stabilizace onemocnění, 2. cyklus – progresse onemocnění) a následně EGFR-TKI (velmi dobrá odpověď na léčbu po dobu 22 měsíců, poté progresse onemocnění). Pravděpodobně se jedná o případ získané rezistence na terapii EGFR-TKI spojený s výskytem sekundární mutace T790M. Případ potvrzuje vhodnost rozšíření spektra zá-

chyťových metod u vzorků s aktivační mutací EGFR o metody detekující mutaci T790M.

### **Vysokokapacitní DNA sekvenování v molekulární diagnostice onkologických markerů EGFR signální dráhy**

**Petr Vojta, Sylwia Jančík, Zuzana Macečková, Jana Stránská, Jiří Drábek, Marián Hajdúch**

Ústav molekulární a translační medicíny LF UP v Olomouci a FN Olomouc

Na úspěšnost léčby u plicních adenokarcinomů a karcinomu kolorekta má kauzální význam vyšetření regulátorů buněčného cyklu EGFR signální dráhy (EGFR, KRAS, BRAF) a následná volba vhodné terapie.

Vysoká míra heterogenity somatických mutací a jejich minoritní podíl v nádoru je často limitující faktor pro volbu diagnostické metody s požadovanou senzitivitou. Narozdíl od současných metod založených především na real-time PCR detekci vybraných mutací umožňují nové metody DNA vysokokapacitního sekvenování (NGS) individualizovanou flexibilitu vyšetřovacích celoxonových panelů jmenovaných genů při zachování velmi nízkého detekčního limitu. Srovnání našich pilotních výsledků klasických molekulárních vyšetření u detekce mutací genů EGFR, KRAS a BRAF s ampliconovým sekvenováním NGS ukazuje na potenciál diagnostického použití těchto nových metod.

*Poděkování: Projekt byl proveden za přispění grantu MPO TIP FR-T11/525 a CZ.1.05/2.1.00/01.0030.*

### **p16 – aktuální pohled na diagnostiku karcinomu cervixu**

**Milan Richter**

ROCHE, s.r.o., Division Diagnostics

Metody screeningu a diagnostiky karcinomu cervixu jsou v poslední době předmětem řady

studií. Základní a nejrozšířenější metodou zůstává vyšetření cytologie metodou PAP. Nesporný pokrok oproti klasickým cytologickým stěrům přinesla LBC. Stále častěji se jako screeningová metoda uplatňuje PCR stanovení HR-HPV, která umožňuje rozlišit pacientky s vysokým rizikem, které nebyly zachyceny cytologickým vyšetřením. V případě pozitivního výsledku některé ze screeningových metod je vhodné posouzení rizika za pomoci stanovení proteinu p16 v cytologickém materiálu a v případě biopsie i v těchto vzorcích.

Protein p16 hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu a při diferenciaci buněk. V normálních buňkách je přítomen v nízkých koncentracích a obvykle není detekovatelný metodami IHC. U některých nádorů byla prokázána zvýšená produkce p16, která je projevem deregulace buněčného cyklu a je tudíž využitelná pro diagnostiku metaplastických změn cervixu.

Pro cytologické vzorky se používá souprava CINtec® Plus Cytology CE/IVD. Slouží k současné detekci p16 a Ki-67. Koexprese těchto dvou parametrů v jedné buňce jednoznačně indikuje deregulaci buněčného cyklu a je sama o sobě důvodem pro kolposkopii. Současné stanovení obou parametrů je nutné vzhledem k nemožnosti přesně lokalizovat původ jednotlivé buňky obsažené v cytologickém vzorku.

Pro bioptické vzorky je určena souprava CINtec® p16 Histology CE/IVD (manuální nebo automatizovaná verze pro Ventana Benchmark). Je to IHC test pro kvalitativní detekci proteinu p16INK4a na formalínem fixovaných vzorcích zalitých do parafinu připravených z cervikálních biopsií. Je určen pro použití ve spojení s H&E barvenými preparáty připravenými ze stejných biopsií jako metoda pro zvýšení přesnosti diagnózy a shody mezi různými hodnotiteli při diagnostikování high-grade cervikální intraepiteliální neoplazie. (Doporučení CAP a ASCCP) Zpřesněním diagnostiky se tak může omezit počet radikálních zásahů, jako jsou konizace.

## Poškození a modifikace DNA

pátek / 30. listopadu 2012 / 11.20–12.50 hod.

### Intracelulární sekvestrace ellipticinu – příčina chemorezistence a možnost zesílení účinku?

Jan Hraběta<sup>1</sup>, Jitka Poljaková<sup>2</sup>, Jan Uhlík<sup>3</sup>, Marie Stiborová<sup>2</sup>, René Kizek<sup>4</sup>, Tomáš Eckschlager<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup>Katedra biochemie, PFF UK, Praha

<sup>3</sup>Ústav histologie a embryologie, 2. LF UK, Praha

<sup>4</sup>Ústav biochemie, Mendlova univerzita, Brno

**Úvod:** Ellipticin (EL) je alkaloid izolovaný z rostlin čeledě toješťovitých. Některé jeho deriváty vykazují protinádorové účinky a v některých zemích jsou používány k terapii karcinomu prsu a AML. EL zastavuje buněčný cyklus regulací cyklinu B1 a Cdc2 a indukuje apoptózu tvorbou volných radikálů, aktivací systému Fas/Fas ligand a iniciací mitochondriální apoptotické dráhy, regulací proteinů z rodiny Bcl-2 dále zvyšuje expresi nemutovaného p53 a obnovuje funkci mutovaného p53. Kromě toho rozpojuje mitochondriální oxidativní fosforylaci. Předpokládáme, že hlavním mechanismem protinádorového účinku je interkalace do DNA, inhibice topoisomerázy II a hlavně tvorba kovalentních DNA aduktů. K tvorbě DNA aduktů je nezbytná aktivace cytochromy P450 a peroxidázami. Proto jeho účinek závisí na obsahu těchto enzymů v cílových tkáních a buňkách.

Chemorezistence je jednou z příčin selhání terapie nádorů. Většinou je vyvolána kombinací více mechanismů. Hlavní mechanismy jsou:

1. zvýšené vylučování léku z buňky,
2. změny exprese nebo modifikace cílové struktury,
3. změny enzymů aktivujících nebo detoxikujících lék,
4. indukce antiapoptotických nebo inhibice proapoptotických mechanismů,
5. změny metabolismu nebo vylučování léku nebo snížená dostupnost.

Jedním z popsaných mechanismů je „vyčytání“ léku v cytoplazmatických vezikulách, což zabrání jeho působení na cílové struktury. U buněk rezistentních k doxorubicinu bylo popsáno jeho vychytávání v lysozomech. Dále však nebyl tento jev studován.

**Metody:** Buněčné linie: odvozené od neuroblastomu SK-N-AS – bez amplifikace MYCN, UKF-NB-4 – s amplifikací MYCN, UKF-NB-4ELLI – rezistentní k EL. Buněčná smrt: vazba AnnexinuV a DAPI hodnocená průtokovou cytometrií, aktivita kaspázy 3, MTT test a sledování růstu buněk měřením impedance přístrojem eXcelligence. Detekce EL v buňkách: konfokální fluorescenční mikroskopie, průtokovou cytometrií a laserovou skenovací mikroskopie. Průkaz autofagie: detekce LC-3II Western blottingem a elektronová mikroskopie. Detekce kovalentní modifikace DNA elektrochemicky a metodou P32 postlabeling.

**Výsledky a diskuze:** Neuroblastomové buňky vytváří při kultivaci s EL již během hodiny vakuoly obsahující EL (průkaz ve fluorescenčním mikroskopu). Elektronová mikroskopie a průkaz minimální konverze LC-3 I na LC-3 II nesevídčí pro autofagii. U linie UKF-NB-4ELLI rezistentní k EL jsme prokázali zvýšenou expresi V-ATPázy (protein membrány lysozomů umožňující funkci protonové pumpy, ta transportuje protony do lysozomu a udržuje v nich nízké pH). Pro účast sekvestrace na rezistenci k EL svědčí i fakt, že fluorescence celých buněk rezistentní i senzitivní linie kultivovaných v mediu s EL byla stejná, ale významně nižší byla fluorescence jader rezistentní linie než senzitivní, sekvestrace v lysozomech rezistentních buněk tedy „ochránila“ jádro. Kombinace EL s bafilomycinem (specifický inhibitor V-ATPázy) nebo s chloroquinem (zvyšuje lysozomální pH a inhibuje fúzi autofagozomů s lysozomy) zvýšila indukci apoptózy u senzitivní i rezistentní linie. Obdobný efekt nevykazoval wortmanin, který blokuje časná stadia autofagie, ale neovlivňuje lysozomální pH ani aktivitu V-ATPáz. Z toho plyne, že účinek EL je inhibován sekvestrací v lysozomech a ne autofagií. Elektrochemicky a postlabelingem jsme prokázali vyšší množství aduktů u buněk inkubovaných s EL a bafilomycinem nebo chloroquinem než se samotným EL.

**Závěry:** Naše výsledky ukazují, že na rezistenci k EL se podílí sekvestrace léku v lysozomech. Inhibice V-ATPázy tuto rezistenci potlačí. Jsou literární údaje, že tento mechanismus se podílí i na chemorezistenci k jiným lékům. Lze proto předpokládat, že inhibitory V-ATPázy mohou potencovat účinek některých cytostatik.

*Práce vznikla za finanční podpory GA ČR (grant P301/10/0356).*

### Cellular DNA damage response in the context of cell cycle

Martin Mistrík, Jiří Bártek

Institute of Molecular and Translational Medicine, Laboratory of Genome Integrity, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

Among the most serious forms of DNA damage belong so called double-strand breaks (DSB) which have the biggest impact on genomic stability and always introduce life-threatening situation. Cellular response to DSB is a complex process involving multiple pathways which can be structured between DSB recognition; repair and other related cellular processes (e.g. checkpoint activation). Importantly, complexation of these responses is very much dependent on the cell-cycle stage. We used advanced microscopic techniques for a better insight into process taking place at sites of DNA damage during different stages of cell cycle with emphasis on mitosis.

### Telomerase – an unusual enzyme with unusual functions

Juraj Kramara

Laboratory of Genome Integrity, IMTM, Olomouc

Telomerase is an unusual reverse transcriptase carrying its own template. The primary function of telomerase is to maintain the ends of nuclear chromosomes – telomeres. As a key player in chromosomal stability telomerase also has a prominent role in bypassing cellular senescence and cancer progression. Interestingly, non-canonical functions of telomerase have been also reported with no apparent connection to the well-established function of telomerase in telomere maintenance. Throughout the lecture the functions of telomerase and its involvement in cancer progression will be discussed.

### Study of epigenetic 5-azacytidine nucleosides and their derivatives

Khushboo Agrawal, Ivo Frydrych, Petr Džubák, Marián Hajdúch

Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

Aberrant DNA methylation is a major hallmark of cancer. In cancer cells, global hypomethylation is accompanied by hypermethylated and transcriptionally silenced tumor suppressor and other cancer related genes, and contribute to the loss of proliferation control. The reversal of these epimutations can therefore restore proliferation control and apoptosis sensitivity. The cytosine analogues 5-azacytosine (azacytidine) and 2'-deoxy-5-azacytidine (decitabine) function as DNA methyltransferase inhibitors and have shown substantial potency in reactivating epigenetically silenced tumor suppressor genes in vitro and are currently most advanced drugs for epigenetic cancer therapies.

To characterize the demethylating activity of 5-azacytidine nucleosides and their derivatives we established a fluorescence detection system with high sensitivity that involves an endogenous promoter CpG island (CGI). Promoter CGI of FLJ32130 gene was found to be methylated in HCT116 cells and respond sensitively to decitabine by abundantly re-expressing its mRNA, therefore FLJ32130 gene was selected as a targeting site. Exon 3 of the FLJ32130 gene was more than 2 kb apart from the promoter CGI and it was expected that targeting of the exon would not affect the methylation status of the promoter CGI; therefore a targeting vector was constructed to replace exon 3 of the FLJ32130 gene with a fusion of IRES, Hygromycin and EGFP. To construct the reporter cell we trans-

duced HCT116 cells with the linearized vector and isolated one clone that had the expected homologous recombination outcomes. It was expected that the Hygr<sup>r</sup>-EGFP fusion protein would not be expressed as long as the promoter CGI was kept methylated, but that it would be expressed when the CGI was demethylated. Under the fluorescence microscope, we examined the appearance of green fluorescence before and after addition of decitabine and the anticipated fluorescence was readily confirmed after addition of 1  $\mu$ M decitabine.

Furthermore, the DNA methylation inhibitor 2'-deoxy-5-azacytidine develops resistance during treatment and mechanisms of resistance remain unknown, therefore we are currently investigating the mechanism of resistance to decitabine.

*This work is supported by grants: Medical faculty internal grant UP (LF\_2012\_018), BIOMEDREG (CZ.1.05/2.1.00/01.0030) and GACR (303/09/H048).*

### **ATR-Chk1-APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7-ASK/Dbf4 kinase complex is required for DNA damage bypass pathway**

Masayuki YAMADA

Laboratory of Genome Integrity, IMTM, Olomouc

Cdc7 kinase was originally found in budding yeast as an essential factor for chromosomal

DNA replication. Recent accumulating data strongly suggest that Cdc7 kinase plays important roles not only in DNA replication but also in other DNA metabolism such as DNA repair and DNA recombination. Here I show the regulatory mechanism and biological significance of stabilization of human Cdc7-ASK/Dbf4 kinase complex upon DNA replication block. Stalled replication induces stabilization of the active Cdc7-ASK/Dbf4 kinase complex, which is dependent on ATR-Chk1 checkpoint pathway. Stability of the Cdc7-ASK/Dbf4 complex is also regulated by APC/CCdh1 pathway.

Furthermore, I show that ASK/Dbf4 protein interacts with Rad18 ubiquitin ligase and that this interaction is required for chromatin accumulation of Rad18. The impaired chromatin accumulation of Rad18 leads to inefficient chromatin binding of translesion DNA polymerases, pol.  $\eta$ . Interestingly, depletion of ASK does not impair foci formation of Rad51, an essential factor for homologous recombination repair, suggesting that Cdc7 kinase is specifically involved in DNA damage bypass pathway. These findings define a novel signaling pathway that connects replication checkpoint pathway and ubiquitin-proteasome pathway to DNA damage bypass pathway.

Finally, I would like to talk about the possibility that Cdc7 kinase- and Rad18 ubiquitin ligase-dependent damage bypass pathway could be a promising target for cancer chemotherapy.



EGFR M+

# 1. linie léčby pokročilého NSCLC u pacientů s EGFR M+

**IRESSA® v monoterapii prokázala významně vyšší účinnost\*  
oproti kombinované chemoterapii v 1. linii léčby  
pokročilého NSCLC u pacientů s EGFR M+<sup>1-3</sup>**

EGFR M+ (pozitivní mutace receptoru pro epidermální růstový faktor)  
\* v parametru progression free survival (PFS)



**IRESSA®**  
gefitinib

**ZKRÁCENÁ INFORMACE O PŘÍPRAVKU IRESSA®:** Léčivá látka: gefitinibum. **Indikace:** IRESSA je indikována k léčbě dospělých pacientů s lokálně pokročilým nebo metastazujícím nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) s aktivačními mutacemi EGFR-TK. **Dávkování:** Jedna 250 mg tableta jednou denně. Bezpečnost a účinnost přípravku nebyla u dětí a adolescentů hodnocena. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku tohoto přípravku. Kojení. **Interakce:** Současné podávání s účinnými inhibitory CYP3A4 může zvýšit plazmatické koncentrace gefitinibu, které může být klinicky relevantní. Zvýšení může být vyšší u jednotlivých pacientů s genotypem pomalých metabolizátorů vázaných na CYP2D6. Látky indukující aktivitu CYP3A4 mohou zvyšovat metabolismus a snižovat plazmatické koncentrace gefitinibu a tím snižovat účinnost přípravku IRESSA, proto by jejich podávání mělo být vyloučeno. U některých pacientů užívajících warfarin současně s gefitinibem bylo zaznamenáno zvýšení INR a/nebo výskyt krvácení. **Zvláštní upozornění:** Pacienti se středně závažným až závažným poškozením jater v důsledku jaterní cirhózy mají zvýšené plazmatické koncentrace gefitinibu. Pokud dojde u pacientů ke zhoršení respiračních symptomů jako je dyspnoe, kašel a horečka, podávání přípravku IRESSA je třeba přerušit a pacient by měl být rychle vyšetřen. Pacienti, u kterých je vzhledem k příznakům a projevům, např. akutní nebo zhoršující se zánět očí, slzení, citlivost na světlo, neostře vidění, bolest v očích a/nebo červené oči, podezření na zánět oční rohovky, mají být neodkladně odesláni k oftalmologovi. Byly hlášeny jednotlivé případy GIT perforace u pacientů s existujícími rizikovými faktory. IRESSA nemá žádný nebo má zanedbatelný vliv na schopnost řídit nebo obsluhovat stroje. **Nežádoucí účinky:** Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky jsou průjem a kožní nežádoucí účinky (zahrnující vyrážku, akné, suchou kůži a svědění). Další hlášené nežádoucí účinky jsou nechutenství, zvracení, slabost, krvácení (např. krvácení z nosu a krev v moči), intersticiální plicní nemoc, změny jaterních parametrů (zvýšení ALT, AST a celkového bilirubinu), proteinurie a alopecie. **Těhotenství a kojení:** Ženy ve fertilním věku musí být poučeny, že v průběhu léčby nesmí otěhotnět. IRESSA by neměla být podávána během těhotenství, pokud to není nezbytné. IRESSA je kontraindikována v průběhu kojení. Kojení je nutné přerušit v průběhu léčby přípravkem IRESSA. **Balení přípravku:** 30 potahovaných tablet v jednom balení. **Uchovávání:** Uchovávejte v původním obalu, aby byl přípravek chráněn před vlhkostí. **Držitel registrace:** AstraZeneca AB, S-151 85, Södertälje, Švédsko. **Registrační čísla:** EU/1/09/526/001, EU/1/09/526/002. **Datum revize textu:** 20. 4. 2012. **Referenční číslo dokumentu:** 20042012API. **Výdej léčivého přípravku vázán na lékařský předpis a přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Předtím, než přípravek předepíšete, pečlivě prostudujte Souhrn údajů o přípravku.** Podrobné informace o tomto přípravku jsou uveřejněny na webových stránkách Evropské agentury pro léčivé přípravky [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu). Registrovaná ochranná známka IRESSA je majetkem AstraZeneca plc. © AstraZeneca 2012

#### Reference:

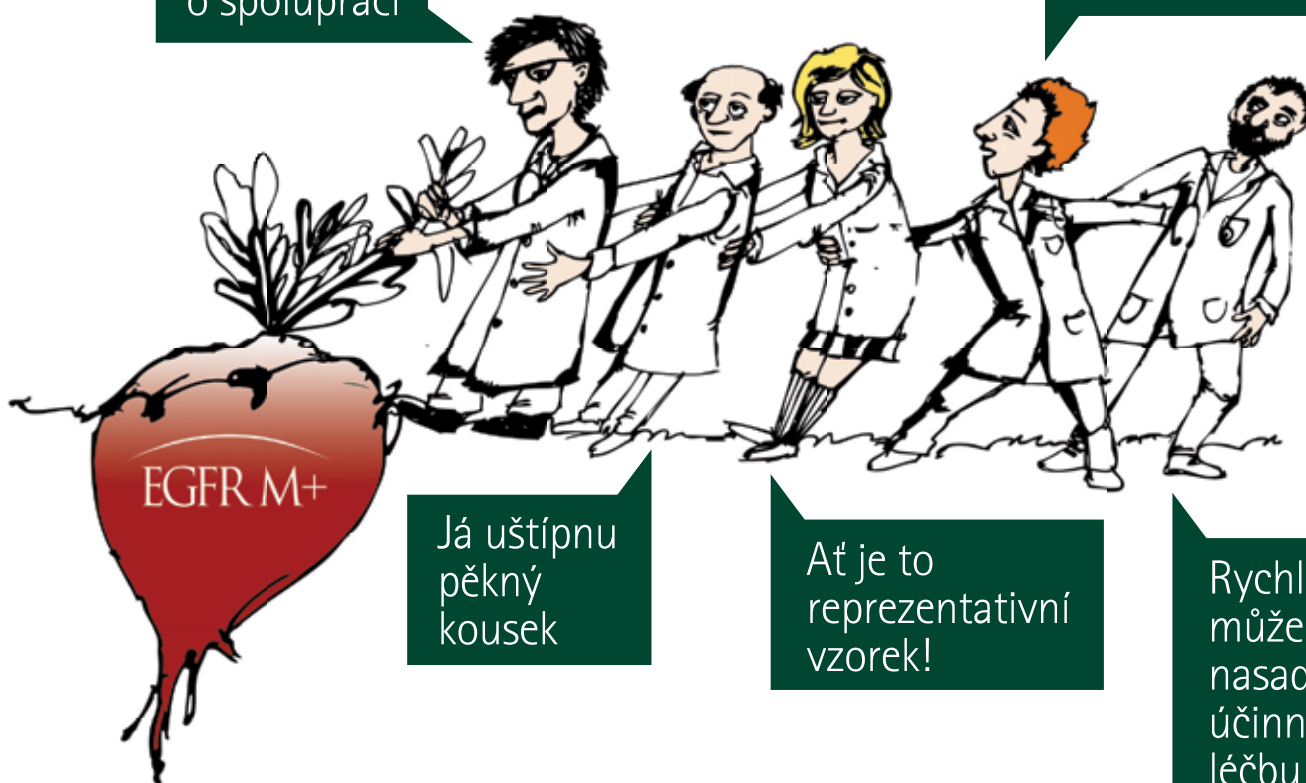
1. Mok TS et al. *New Engl J Med* 2009; 361(10): 947–957.
2. Maemondo M et al. *N Engl J Med* 2010; 362: 2380–2388.
3. Mitsudomi T et al. *Lancet Oncol* 2010; 11: 121–128.

**AstraZeneca** 



Prosím Vás  
o spolupráci

Prosím o dostatek  
kvalitní DNA!



# Rychlost a kvalitní spolupráce dává šanci

**IRESSA**<sup>®</sup>  
gefitinib

**Zkrácená informace o přípravku Iressa<sup>®</sup>:** Léčivá látka: gefitinibum. **Indikace:** IRESSA je indikována k léčbě dospělých pacientů s lokálně pokročilým nebo metastazujícím nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) s aktivačními mutacemi EGFR-TK. **Dávkování:** Jedna 250 mg tableta jednou denně. Bezpečnost a účinnost přípravku nebyla u dětí a adolescentů hodnocena. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku tohoto přípravku. Kojení. **Interakce:** Současné podávání s účinnými inhibitory CYP3A4 může zvýšit plazmatické koncentrace gefitinibu, které může být klinicky relevantní. Zvýšení může být vyšší u jednotlivých pacientů s genotypem pomalých metabolizátorů vázaných na CYP2D6. Látky indukující aktivitu CYP3A4 mohou zvyšovat metabolismus a snižovat plazmatické koncentrace gefitinibu a tím snižovat účinnost přípravku IRESSA, proto by jejich podávání mělo být vyloučeno. U některých pacientů užívajících warfarin současně s gefitinibem bylo zaznamenáno zvýšení INR a/nebo výskyt krvácení. **Zvláštní upozornění:** Pacienti se středně závažným až závažným poškozením jater v důsledku jaterní cirhózy mají zvýšené plazmatické koncentrace gefitinibu. Pokud dojde u pacientů ke zhoršení respiračních symptomů jako je dyspnoe, kašel a horečka, podávání přípravku IRESSA je třeba přerušit a pacient by měl být rychle vyšetřen. Pacienti, u kterých je vzhledem k příznakům a projevům, např. akutní nebo zhoršující se zánět očí, slzení, citlivost na světlo, neostré vidění, bolest v očích a/nebo červené oči, podezření na zánět oční rohovky, mají být neodkladně odesláni k oftalmologovi. Byly hlášeny jednotlivé případy GIT perforace u pacientů s existujícími rizikovými faktory. IRESSA nemá žádný nebo má zanedbatelný vliv na schopnost řídit nebo obsluhovat stroje. **Nežádoucí účinky:** Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky jsou průjem a kožní nežádoucí účinky (zahrnující vyrážku, akné, suchou kůži a svědění). Další hlášené nežádoucí účinky jsou nechutenství, zvracení, slabost, krvácení (např. krvácení z nosu a krev v moči), intersticiální plicní nemoc, změny jaterních parametrů (zvýšení ALT, AST a celkového bilirubinu), proteinurie a alopecie. **Těhotenství a kojení:** Ženy ve fertilním věku musí být poučeny, že v průběhu léčby nesmí otěhotnět. IRESSA by neměla být podávána během těhotenství, pokud to není nezbytné. IRESSA je kontraindikována v průběhu kojení. Kojení je nutné přerušit v průběhu léčby přípravkem IRESSA. **Balení přípravku:** 30 potahovaných tablet v jednom balení. **Uchovávání:** Uchovávejte v původním obalu, aby byl přípravek chráněn před vlhkostí. **Držitel registrace:** AstraZeneca AB, S-151 85, Södertälje, Švédsko. **Registrační čísla:** EU/1/09/526/001, EU/1/09/526/002. **Datum revize textu:** 20. 4. 2012. **Referenční číslo dokumentu:** 20042012API. **Výdej léčivého přípravku vázán na lékařský předpis a přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Předtím, než přípravek předepíšete, pečlivě prostudujte Souhrn údajů o přípravku.** Podrobné informace o tomto přípravku jsou uveřejněny na webových stránkách Evropské agentury pro léčivé přípravky <http://www.ema.europa.eu/>. Registrovaná ochranná známka IRESSA je majetkem AstraZeneca plc. © AstraZeneca 2012.

#### Reference:

1. Mok TS et al. New Engl J Med 2009; 361(10): 947–957.
2. Maemondo M et al. N Engl J Med 2010; 362: 2380–2388.
3. Mitsudomi T et al. Lancet Oncol 2010; 11: 121–128.

EGFR M+ pozitivní mutace receptoru pro epidermální růstový faktor

AstraZeneca 



## Nová protinádorová léčiva

pátek / 30. listopadu 2012 / 13.45–15.30 hod.

### **In vitro testování účinnosti na komplementu závislé cytotoxicity monoklonálních protilátek určených pro léčbu B-buněčných malignit**

Marek Borský, Tomáš Loja, Michael Doubek  
Laboratoř průtokové cytometrie, Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK, FN Brno

Vývoj v oblasti monoklonálních protilátek jako léčiv určených pro hematologické malignity přináší další vylepšená léčiva. Příkladem je preparát Arzerra obsahující monoklonální protilátku ofatumumab (anti-CD20), která má oproti své předchůdkyni, protilátce rituximab (anti-CD20), vylepšené vlastnosti. Vyšší účinnost ofatumumabu se týká především oblasti na komplementu závislé cytotoxicity. Ofatumumab je již podáván některým pacientům s refrakteriemi při chronické lymfatické leukemii (CLL). Přesto je studium účinků a účinnosti těchto preparátů stále vysoce aktuální, protože řada procesů spojených s jejich působením není ještě zcela objasněna.

Cílem naší práce je zavést do praxe pokud možno jednoduchý nástroj pro testování cytotoxicity závislé na komplementové dráze indukované monoklonálními protilátkami v podmínkách in vitro. Popsat podstatné zákonitosti tohoto procesu a pokusit se najít možnosti využití tohoto testování jako predikčního nástroje u B-buněčných malignit.

V první fázi našeho projektu jsme testovali 12 B-buněčných tkáňových linií na lytickou odpověď na protilátku ofatumumab a rituximab s pomocí průtokové cytometrie. Jednoduchý test byl vytvořen v podmínkách in-vitro, kdy buňky v přítomnosti 20% aktivního směsného lidského séra, léčiva a propidium iodidu (PI) byly inkubovány 30 min v 37°C. Buňky, v jejichž plazmatické membráně se vytvořily póry vlivem formace MAC komplexů, nedokázaly zabránit průniku PI do jádra a staly se tak pozitivní pro fluorescenční signál v oblasti pro PI měřený průtokovým cytometrem. Kombinací údajů o absolutním a relativním množství buněk před a po proběhnutí testu bylo vypočítáno množství rezistentních buněk a jimi byla vyjádřena účinnost léčiva. Aby mohly být testy správně interpretovány a opakovány se shodnými výsledky, byla sledována řada dalších faktorů ovlivňujících účinnost léčiva v daném testovacím systému. Jsou to: exprese

povrchového antigenu CD20 a buněčných regulátorů komplementové dráhy CD21, CD35, CD46, CD55, CD59, koncentrace léčiva a lidského séra i vazebné podmínky pro použité protilátky. Naše výsledky se většinou shodují s pozorováními ostatních vědeckých týmů testujících účinnost anti-CD20 protilátek v podobných podmínkách. Nad to byla učiněna některá nová pozorování, která ukazují, že například proces lýzy buněk závislý na komplementové dráze spouštěné vazbou protilátky je závislý nejen na koncentraci protilátky, ale také na koncentraci buněk v reakci. Jiné naše experimenty ukázaly schopnost modifikace vazebných podmínek pro protilátky potenciovat celý lytický proces.

Úspěšná první fáze projektu umožnila zahájit druhou fázi projektu, ve které testujeme B lymfocyty pacientů s CLL na lytickou odpověď iniciovanou léčivem ofatumumab a rituximab. Cílem je shromáždit data o expresi podstatných povrchových molekul CD20, CD21, CD35, CD46, CD55, CD59 B lymfocytů od 50 neléčených CLL pacientů a dát je do vztahu k výsledkům účinnosti léčiv v aktivaci komplementové dráhy v našich in-vitro testech. První testované primární vzorky vykazují oproti tkáňovým liniím vnitřní heterogenitu v odpovědi na aktivaci lytické dráhy komplementu, která naznačuje, že B lymfocyty CLL pacientů jsou směsí rezistentních, slabě citlivých a silně citlivých buněk na lýzu komplementem.

Třetí fáze projektu by měla ukázat korelaci našich in-vitro testů se skutečnou účinností léčby, aby se mohla uzavřít otázka schopnosti našich in vitro testů predikovat léčebnou odpověď in vivo. Práce koncepčně navazuje na souběžný výzkum na našem pracovišti v oblasti testování monoklonálních protilátek ve vztahu k apoptóze.

### **In vitro proteomické profilování buněčné linie CEM platinovými protinádorovými léčivy**

Tomáš Oždian<sup>1</sup>, Dušan Holub<sup>1</sup>, Petr Džubák<sup>1</sup>, Gabriela Rylová<sup>1</sup>, Madhusudhan Kolbreydy Reddy Kollareddy<sup>1</sup>, Jiří Řehulka<sup>1</sup>, Lenka Radová<sup>1</sup>, Dana Cahová<sup>1</sup>, Vladimír Havlíček<sup>2</sup>, Marián Hajdúch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc

<sup>2</sup>Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha

Platinová léčiva jsou již dlouhou dobu neodmyslitelnou součástí protinádorové terapie. Přes svou chemickou i biologickou podobnost se liší ve spektru nádorů, jež jsou jimi léčeny. Naším cílem bylo charakterizovat proteomické profily po použití těchto léčiv na modelové nádorové linii. Aby jejich porovnání získalo vyšší výpovědní hodnotu, přidali jsme do testovaného souboru vinkristin a daunorubicin jako chemicky a funkčně nepříbuzná léčiva. K profilování jsme zvolili buněčnou linii CCRF-CEM odvozenou od akutní lymfoblastické leukemie, která se vyznačuje dostatečnou citlivostí na širokou škálu běžně používaných cytostatik. Buněčná linie byla označena izotopicky značenými aminokyselinami a následně ošetřena vybranými léčivy o koncentraci 5xIC<sub>50</sub>. Doba ošetření byla definována jako polovina času do indukce apoptózy. Takto ošetřené buňky byly smíchány s neznačenými kontrolními v poměru 1:1, lyzovány a následně separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy, kde byly rozděleny do 45 frakcí. Jednotlivé elektroforetické frakce jsme podrobili štěpení trypsinem a analyzovali pomocí HPLC-MS. Pro získání co nejvyššího počtu identifikovaných peptidů jsme použili dva hmotnostně spektrometrické přístupy: MALDI-TOF/TOF, LC-MS/MS. Získaná hmotnostní spektra byla analyzována algoritmy Mascot a Phenyx a kompilována v databázovém systému Proteinscape. Celkově jsme identifikovali 646 ± 133 proteinů metodou LS-MS/MS a 312 ± 85 proteinů metodou MALDI v jednom opakování. Identifikované a kvantifikované proteiny jsme vyhodnotili statistickými metodami. Metodou hierarchického clusterování jsme zjistili dle očekávání blízkou příbuznost cis a karboplatiny, překvapením však byla odlehlost oxaliplatinu. Analýzou hlavní komponenty byly určeny proteiny odpovědné za tento stav, a tyto jsou validovány metodou Western blot.

*Tento projekt byl podpořen interním grantem Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (LF\_2012\_018); infrastrukturální část tohoto projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena z Operačního programu Věda a výzkum pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).*

### **Identifikace cílů protinádorových léčiv pomocí afinní purifikace**

Gabriela Rylová<sup>1</sup>, Petr Džubák<sup>1</sup>, Anna Janošťáková<sup>1</sup>, Ivo Frydrych<sup>1</sup>, Petr Konečný<sup>1</sup>, Dušan Holub<sup>1</sup>, Tomáš Oždian<sup>1</sup>, Dalibor

Doležal<sup>1</sup>, Miroslav Soural<sup>2</sup>, Jan Hlaváč<sup>2</sup>,  
Marián Hajdúch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř experimentální medicíny, Institut  
molekulární a translační medicíny, LF UP  
a FN Olomouc

<sup>2</sup>Katedra organické chemie, Institut  
molekulární a translační medicíny, PřF UP,  
Olomouc

Znalost cílů protinádorových léčiv je důležitá zejména pro optimalizaci struktury léčiva a potlačení vedlejších efektů těchto látek. Byla vyvinuta řada proteomických metod k určení molekulárních cílů malých molekul. Jednou z nich je afinitní chromatografie, která byla v této oblasti v mnoha obměnách úspěšně aplikována.

Zabýváme se skupinou chinolonových derivátů, u kterých byla popsána antibakteriální, antiprotozoální, cytotoxická a imunosupresivní aktivita. Dlouhodobě testujeme chemické knihovny těchto látek, přičemž byla identifikována řada zajímavých derivátů s cytotoxickými účinky v sub-mikromolárních koncentracích.

Látky jsme dále testovali průtokovou cytometrií na analýzu buněčného cyklu a inhibici DNA/RNA syntézy. Deriváty zastavovaly buňky přednostně v G1 fázi buněčného cyklu souběžně s výraznou inhibicí DNA a RNA syntézy.

Neúčinnější derivát byl testován v in vivo nádorovém modelu, kdy byla s výhodou využita metoda „hollow fibres“ (Cellmax). Do myši byly implantovány dutá vlákna s nádorovými buňkami leukemické linie CEM. Myš byla následně léčena testovanou látkou. Dutá vlákna byla po 14 dnech vyjmuta a přežívající buňky byly podrobeny cytotoxickému MTT testu. Účinnost testované látky byla srovnatelná s doxorubicinem.

U takto účinných látek je výhodné pro další vývoj znát jejich přesný mechanismus účinku a molekulární cíle. K identifikaci proteinových cílů jsme zvolili metodu afinitní purifikace spojenou s hmotnostní spektrometrií. Purifikace proběhla na streptavidinem pokrytých magnetických kuličkách, na které byl navázán biotinovaný účinný derivát. Takto vzniklý komplex jsme inkubovali s buněčným lyzátem linie CEM a po odmytí nespecifických proteinů jsme navázané proteiny separovali na 1D SDS PAGE. Jejich identifikace proběhla metodami LC-MS/MS a MALDI. Identifikované potenciální cíle jsou klíčové proteiny metabolismu glukózy, translace a cytoskeletu. Cílové proteiny jsme validovali western blotem a dalšími testy (buněčné modely, kinázové a enzymatické testy, hodnocení in vitro transkripce a translace, studium protei-

nových interakcí, metabolické, proteomické a expresní profilování).

*Tato práce vznikla za podpory grantů: vnitřní grant Lékařské fakulty UP (LF\_2012\_018), BIOMEDREG C.1.05/2.1.00/01.0030*

### **Vliv inhibitorů histondeacetylas na protinádorový účinek etoposidu**

Tomáš Groh<sup>1,2</sup>, Jan Hraběta<sup>2</sup>,  
Jitka Poljaková<sup>1</sup>, Tomáš Eckschlager<sup>2</sup>,  
Marie Stiborová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra biochemie, PřF UK, Praha

<sup>2</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie,  
2. LF a FN v Motole, UK Praha

Etoposid (VP-16), inhibitor topoisomerázy II, je protinádorové léčivo používané v léčbě zhoubných nádorů včetně neuroblastomu. Inhibice aktivity enzymu topoisomerázy II v nádorových buňkách vede k narušení integrity struktury jejich DNA a následně k buněčné smrti.

V této studii jsme testovali účinek VP-16 na lidské neuroblastomové linie v kombinaci s jedním z inhibitorů histondeacetyláz (HDAC), kyselinou valproovou (VPA). Kyselina valproová se používá od 70. let při léčbě epilepsie a bipolárních poruch. Její protinádorové účinky, které souvisí s inhibicí histondeacetyláz, však byly popsány teprve v posledních letech. V práci byl studován účinek etoposidu a kyseliny valproové na chemorezistentní neuroblastomovou buněčnou linii UKF-NB-4 v podmínkách normoxie a hypoxie (1 % O<sub>2</sub>).

Výsledky studie jednoznačně prokazují, že neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-4 je citlivá jak na účinek VP-16, tak i VPA. Za podmínek hypoxie se protinádorové účinky VP-16 snižovaly. Naopak vliv VPA na růst buněk při nedostatečném zásobování kyslíkem (v hypoxii) nebyl pozorován. Vliv VPA na cytotoxicitu VP-16 studovaných nádorových buněk se liší v závislosti na sledu kultivace buněk s těmito látkami. Jako nejvhodnější sled kultivací s vysokou mírou potlačení růstu buněk neuroblastomu se ukazuje preinkubace buněk s VP-16, následovaná kultivací s VPA. Obrácené pořadí kultivací (preinkubace buněk s VPA před kultivací s VP-16) cytotoxicitu etoposidu nezvyšuje. Mechanismus účinku takové kombinované léčby může být vysvětlen na základě ovlivněním buněčného cyklu neuroblastomových buněk. Výsledky ukazují, že obě použítá léčiva mohou změnit poměr jednotlivých fází buněčného cyklu neuroblastomových nádorových buněk.

*Podporováno granty GAUK č. 635712/2012 a GAČR P301/10/0356.*

### **Deriváty kyseliny betulinové inhibují Gli1/2 zprostředkovanou proliferaci glioblastomu**

Jiří Řehulka<sup>1</sup>, Ivo Frydrych<sup>1</sup>,  
Petr Džubák<sup>1</sup>, Andrea Benedíková<sup>1</sup>,  
Veronika Menšíková<sup>1</sup>, Soňa Purová<sup>1</sup>,  
Milan Urban<sup>2</sup>, Jan Šarek<sup>2</sup>,  
Marián Hajdúch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř experimentální medicíny,  
Ústav molekulární a translační medicíny,  
LF UP a FN Olomouc

<sup>2</sup>Katedra organické chemie,  
Ústav molekulární a translační medicíny,  
PřF UP, Olomouc

Signální dráha sonic hedgehog má důležitou úlohu v embryonálním vývoji jedince, je ale také aktivována v některých solidních nádorech. S objevením prvních inhibitorů se stala atraktivním cílem pro léčbu bazocelulárního karcinomu, glioblastomu a nádorů pankreatu. Buněčná signalizace této dráhy spouští transkripční faktory Gli 1 a Gli 2. V souboru malých molekul odvozených od kyseliny betulinové jsme identifikovali inhibitor Gli 1/2 zprostředkované transkripce. Studovaná sloučenina snižovala proliferaci buněk glioblastomu U87-MG in vitro a také expresi cílových genů na úrovni mRNA i proteinů.

*Tato práce vznikla za podpory grantů: vnitřní grant Lékařské fakulty UP (LF\_2012\_018), BIOMEDREG C.1.05/2.1.00/01.0030 a GA ČR 303/09/H048.*

### **SAR analýza 2-fenylsubstituovaných-3-hydroxychinolin-4(1H)-one-karboxamidů na základě jejich vlivu na regulaci buněčného cyklu a toxicity vůči vybraným nádorovým buněčným liniím**

Petr Konečný<sup>1</sup>, Petr Džubák<sup>1</sup>,  
Miroslav Soural<sup>2</sup>, Jan Hlaváč<sup>2</sup>,  
Ivo Frydrych<sup>1</sup>, Gabriela Rylová<sup>1</sup>, Kočiš Petr<sup>1</sup>,  
Marián Hajdúch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř experimentální medicíny,  
Ústav molekulární a translační medicíny,  
LF UP Olomouc

<sup>2</sup>Katedra organické chemie,  
Ústav molekulární a translační medicíny,  
LF UP Olomouc

2-fenylsubstituované-3-hydroxychinolony jsou skupinou látek s výraznými biologickými, zejména imunosupresivními, antiprotozoálními, protinádorovými účinky. Látky jedné

ze zajímavých podskupin, 2-fenylsubstituované-3-hydroxychinolin-4(1H)-one-karboxamidy, byly na základě submikromolární cytotoxicity u různých chemosenzitivních/rezistentních nádorových buněčných linií a příznivého terapeutického indexu analyzovány metodami s důrazem na analýzu buněčného cyklu. Na základě výsledků byl zjištěn diferenční vliv látek

na regulaci buněčného cyklu, DNA, RNA syntézu a fosforylaci fosfohistonu pH3Ser10 na nádorové linii CEM-CCRF. Získaná data byla statisticky zpracována a poskytla informace o změnách monitorovaných účinnů v návaznosti na strukturu těchto látek (SAR). Některé ze zkoumaných látek výrazně ovlivnily buněčný cyklus nádorových buněk nebo měly diferenční aktivitu vůči

p53+/- nádorovým liniím a zdají se být slibné pro další vývoj.

Práce v tomto projektu byla podpořena vnitřním grantem Lékařské fakulty UP (LF\_2012\_018), infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena z Operačního programu – VaVpl (CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

## Postery

### 1| Biodegradabilní komplexy doxorubicinu aplikované na pleteniny pro cílenou léčbu

Andrea Bezděková<sup>1</sup>, Dagmar Chudobová<sup>1</sup>, Jiří Sochor<sup>1,2</sup>, Michal Masařík<sup>1,3</sup>, Karel Bastl<sup>4</sup>, Pavel Kopel<sup>1,2</sup>, Tomáš Eckschlager<sup>5</sup>, Marie Stiborová<sup>6</sup>, Jaromír Hubálek<sup>1,7</sup>, Ivo Provozník<sup>8</sup>, Vojtěch Adam<sup>1,2</sup>, René Kizek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně

<sup>3</sup>Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno

<sup>4</sup>Výzkumný ústav pletafský a.s., Brno

<sup>5</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie, II. LF UK, Praha

<sup>6</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, UK, Praha

<sup>7</sup>Ústav mikroelektroniky

<sup>8</sup>Ústav biomedicínského inženýrství Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT, Brno

Cílená protinádorová léčba využívá různých typů molekul. Mezi velmi výhodné vlastnosti lze zařadit postupné uvolňování léčiva (1). Technologicky je možné léčiva umístit na různé typy nosičů, včetně tkanin či nano-tkanin. Výroba i chirurgické přístupy jsou dobře zvládnuté. V naší práci byly studovány látky chitosan, kyselina hyaluronová a kolagen, které jsou tělu vlastní, se stříbrnými nanočásticemi zajišťujícími antibakteriální efekt a s protinádorovým léčivem doxorubicinem. Sledované komplexy byly spektrometricky a elektrochemicky charakterizovány. Bylo studováno, zda spolu použité látky interagují, a následně byly testovány s bakteriální kulturou z hlediska antimikrobiálního, a s lidskými fibroblasty z hlediska protinádorového. Spektrofotometrická stanovení byla prováděna v rozmezí  $\lambda = 200\text{--}700$  nm, měření probíhalo v 5minutových intervalech. Vzorek byl složen z vodného roztoku nano  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  (100  $\mu\text{M}$ ), a po každém přeměření bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  1% přírodní látky. Signál komplexu kyseliny hyaluronové a nano  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  byl detekován při vlnové délce 268 nm. Interakce nano  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  s 1% kolagenem byla stanovena v 254 nm. Tvorba komplexu chitosanu a nano  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  byla sledována při vlnové délce 256 nm.

Elektrochemická stanovení byla prováděna pomocí metody diferenční pulzní voltametrie. Při titraci roztoku nano  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  o koncent-

raci 100  $\mu\text{M}$ , bylo v 5minutových intervalech do vzorku přidáváno 20  $\mu\text{l}$  1% studované látky. V kombinaci látek nano  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  a kyseliny hyaluronové docházelo ke snížení výšky píku a následnému posunu signálu do záporného potenciálu (z 0,27 V do 0,19 V). Výsledky stanovení interakcí kolagenu a nano  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  vykazují snížení píku vůči standardu nano  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  (100  $\mu\text{M}$ ) a posun signálu píku (z 0,27 V do 0,14 V). V případě reakce chitosanu s nano  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  je patrné posunutí potenciálu do záporných hodnot (z 0,27 V do 0,175 V). Protinádorová studie byla provedena na prostatických nádorových liniích (PC-3, 22RV1) a linii PNT1. Byla sledována viabilita linií v závislosti na aplikované dávce (0; 0,1; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50 a 5,00  $\mu\text{M}$ ) protinádorového léčiva. Inhibiční koncentrace (IC50) u linií PC-3 byla 3,13  $\mu\text{M}$ , u linie 22RV1 1,11  $\mu\text{M}$  a u linie PNT1 1,21  $\mu\text{M}$ . Antimikrobiální efekt byl sledován změnou růstových křivek *S. aureus*, včetně posouzení základního biochemického profilu. Pro studii byly vybrány koncentrace 0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 250; 500 a 1000  $\mu\text{M}$ . Jednou z vlastností doxorubicinu je jeho elektroaktivita, proto bylo pro tuto studii využito měření impedance vzorků. Impedance byla sledována po dobu 24 hodin v pětiminutových intervalech. Z výsledků vyplývá, že koncentrace 6,25; 12,5 ani 25  $\mu\text{M}$  neměla na sledovanou kulturu vliv. Ze získaných impedančních křivek byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace 50  $\mu\text{M}$ . Aplikace 1000  $\mu\text{M}$  sledovanou kulturu zcela inhibovala.

*Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem NanoCeva TA ČR TA01010088.*

1. Dospivova D, et al. Electrochemical behaviour of apoferritin encapsulating of silver (I) ions and its application for treatment of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Electrochem. Sci., 2012; 7(7): p. 6378–6395.

### 2| The monitoring of the doxorubicin in animal muscle tissue

Iva Blažková<sup>1</sup>, Ryvolová Markéta<sup>1,2</sup>, Tomáš Eckschlager<sup>3</sup>, Vojtěch Adam<sup>1,2</sup>, René Kizek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno

<sup>2</sup>Central European Institute of Technology, Brno University of Technology

<sup>3</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2<sup>nd</sup> Medical School, Charles University and University Hospital Motol

To visualize structures and objects in the living organisms a number of imaging techniques

can be used. Common methods include radiography, computed tomography, magnetic resonance imaging and/or positron emission tomography. In the future, the use of optical methods such as fluorescence is expected. Mainly because of its variability, flexibility, specificity, sensitivity, and non-invasivity is this method enhancing rapidly. Among compounds with intrinsic fluorescence also some pharmaceuticals can be included, for example doxorubicin, which is beneficial for its tracking during its presence in the body. Doxorubicin (DOXO), a commonly used cytostatic drug, is an antracycline antibiotic which application is limited with its cardiotoxicity.

In this work, the behavior of the DOXO (2–0.02 mg/ml) was observed by fluorescent method using *in vivo* imaging system (Xtreme, Carestream). First, *in vitro* experiments were carried out either in solution. Fluorescent properties of DOXO were characterized (excitation wavelength: 480 nm, emission wavelength: 600 nm). It was found that strong concentration fluorescence quenching occurs in the DOXO solution (2 mg/ml). The highest fluorescence intensity was observed by 0.06 mg/ml doxorubicin. It was found that the fluorescence is enhanced (10-fold) by the presence of organic solvent – methanol. Subsequently the model tissue – chicken muscle tissue – was injected by doxorubicin using peristaltic pump (100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). This injection system provided good repeatability and accuracy of injected volume with RSD of 5 %. Linear dependence of fluorescence signal on injected DOXO concentration (50–500  $\mu\text{l}$ ) was obtained and subsequently various tissue depths (3 mm, 5 mm, and 7 mm) were investigated to determine the influence of autofluorescence in particular spectral range (450–650 nm). To eliminate the autofluorescence effect the spectral unmixing software was used enabling to distinguish between the signal of the tissue and the drug. It can be concluded that fluorescent properties of certain drugs such as doxorubicin, epirubicin, ellipticin and/or daunorubicin offer the possibility of *in vivo* tracking and monitoring of the therapeutic action. Such investigation is one of the key steps in the development of targeted diagnostics and drug delivery.

*Acknowledgment: The financial support by NanoBioTECell GAČR P102/11/1068 and NANOLABSYS CZ.1.07/2.4.00/31.0023 is highly acknowledged.*



## References

1. Wang HK, Stout DB, Taschereau R, Gu Z, Vu NT, Prout DL, Chatziioannou AF. *Physics in Medicine and Biology*. 2012; 57: 6063.
2. Theodoulou M., Hudis C. *Cancer*. 2004; 100: 2052.
3. Huska D, Adam V, Babula P, Hrabeta J, Stiborova M, Eckschlagler T, Trnkova L, Kizek R. *Electroanalysis*. 2009; 21: 487.
4. Kizek R, Adam V, Babula P, Hrabeta J, Eckschlagler T, Smutny S, Burda JV, Frei E, Stiborova M. *Pharmacology and Therapeutics*. 2012; 133: 26.

### 3 | Prognostic role of PIK3CA mutations and PIK3R1 underexpression in breast cancer

Magdalena Čížková<sup>1,2</sup>, Aurélie Susini<sup>1</sup>,  
Sophie Vacher<sup>1</sup>, Catherine Andrieu<sup>1</sup>,  
Rosette Lidereau<sup>1</sup>, Ivan Bièche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Oncogénétique, Institut Curie, Hôpital René Huguenin, St-Cloud, France

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital Olomouc

**Background:** The PI3K/AKT signaling pathway is frequently deregulated in breast cancer including changes in tyrosine kinase receptors, PI3K, PTEN, AKT and other levels of signalization. The PI3K is a heterodimer kinase which consists of a p110 $\alpha$  catalytic subunit encoded by the PIK3CA gene and a p85 regulatory subunit encoded by the PIK3R1 gene. The PIK3CA oncogene bears activating mutations in up to 40 % cases. These mutations are associated with good patient outcome. On the contrary, PIK3R1 gene appears to play a tumor suppressor role, but the effect on breast cancer patient survival is less known. AKT, one of the central players in the pathway, has also been reported mutated in breast cancer, but less frequently than PIK3CA (in about 5 % cases).

**Materials and methods:** The mutational status of PIK3CA and AKT1, and expression status of PIK3CA, AKT1 and PIK3R1 on mRNA level were assessed in a series of 458 breast cancer samples. We also assessed mRNA expression levels of other genes involved in PI3K pathway, as EGFR, PDK1, PTEN and P70S6K to elucidate the pathway deregulations associated with changed PIK3CA, AKT1 and PIK3R1 states.

**Results:** PIK3CA mutations were identified in 149 (32.5 %) and PIK3R1 underexpression was found in 283 (61.8 %) of the samples. PIK3CA expression deregulation was found only in a minority of the tumor samples: overexpressed in 18 (3.9 %) and underexpressed in 40 (8.7 %) cases. AKT1 mutation was found in 15 (3.4 %) and increase in its expression in 116 (25.3 %) of samples.

PIK3R1 underexpression associated with PIK3CA wild-type status ( $p=0.00097$ ). Tumors

characterized by PIK3R1 underexpression associated with PDK1 overexpression ( $p=0.000004$ ) and EGFR and PTEN underexpression ( $p=0.0096$  and  $p=0.00097$ , respectively). No associations were found between AKT1 status and other parameters. Opposite effects of PIK3CA mutation and PIK3R1 underexpression on patient survival were found. PIK3CA mutation associated with better and PIK3R1 loss with worse MFS ( $p=0.014$  and  $p=0.00028$ , respectively).

**Conclusion:** Results of the present study showed that alterations in PIK3CA and PIK3R1 have opposite impact on PI3K/AKT pathway activation and breast cancer patient survival. There is growing evidence supporting PIK3CA mutations as good prognostic markers in breast cancer, but negative influence of PIK3R1 underexpression on patient survival is less explored. PIK3CA as well as PIK3R1 status could be useful prognostic factors and also predictive factors for treatment with PI3K inhibitors. Both these potential tumor markers warrant further assessment preferably in prospective clinical studies.

### 4 | Komparace dvou kazuistik maligního meningeomu s rozdílnými genetickými aberacemi

Patricie Delongová<sup>1,2</sup>, Jana Bartusková<sup>1</sup>,  
Radoslava Tomanová<sup>1,2</sup>, Jana Dvořáčková<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>ÚP FN Ostrava

<sup>2</sup>Lékařská fakulta Ostravské univerzity v Ostravě, Ostrava

<sup>3</sup>CGB laboratoř, Ostrava

**Úvod:** Meningeomy pomalu vyrůstají z mozkových plen a tvoří 13–26 % všech nádorů nervového systému, většina z nich má příznivou prognózu. Naopak pro podskupinu anaplastického meningeomu (dle WHO grade III) je charakteristické časté recidivování a vzácně i zakládání metastáz, což u pacientů výrazně zkracuje interval přežívání, uvádí se kratší než 2 roky. Tyto maligní nádory se dle literatury vyskytují nejčastěji v 6.–7. deceniu. Mezi časté aberace u anaplastického meningeomu patří delece lokusu BCR a na chromozomech 6q, 9p, 10 a 14q, 1p36, amplifikace na chromozomech 20q, 12q, 15q, 1q, 9q a 17q a monozomie chromozomu 14. Ve FNO bylo diagnostikováno v období od ledna 2002 do listopadu 2012 celkem pět pacientů s maligním meningeomem, z čehož u třech z nich bylo provedeno genetické vyšetření.

**Záměr:** Porovnání dvou nejzajímavějších kazuistik pacientů s maligním meningeomem.

**Kazuistika:** Prvním hodnoceným případem je muž, 43 let. Atypický meningeom ve stropu

postranní komory mu byl diagnostikován v září 2008, ve věku 40 let. Po exstirpaci první recidivy byl histologicky prokázán nádor vyššího gradu – meningeom anaplastický, který opakovaně recidivoval a metastazoval do plic a do mediastina, po exstirpacích progredoval a prorůstal do okolních orgánů. V genetickém vyšetření byly nalezeny změny, které jsou dle literatury nalézány u vyšších gradů meningeomů a jsou spojeny s horší prognózou, jedná se o nadpočetné kopie lokusů 9q34,1q25 a 11q13. Pacientův zdravotní stav se náhle zhoršil v lednu 2012. Pacient začal být výrazně dušný a objevily se otoky horních končetin a hlavy. Terapie byla pouze paliativní. Pacient zemřel v květnu 2012 na masivní plicní embolizaci den po operaci subtrochanterické zlomeniny. Od pitvy bylo upuštěno.

Druhý případ je žena, 44 let. Anaplastický meningeom tvrdé pleny jí byl diagnostikován v roce 2002, ve věku 36 let. První recidiva tumoru byla ozářena gama nožem, další recidiva byla exstirpována a operovaná oblast byla ošetřena radioterapií. Do listopadu 2010 pacientka absolvovala celkem 22 exstirpací, poté jí byla provedena zevní komorová drenáž se zavedením ventrikuloperitoneálního shuntu. Pro malfunkci shuntu byla indikována akutní revize jeho centrální části, po více než tříměsíční hospitalizaci pacientka zemřela na operačním stole. Byla provedena pitva. V dolním laloku levé plice zastižena metastáza meningeomu. Genetické vyšetření nádoru prokázalo deleci lokusu BCR a 1p36 a dále monozomii chromozomu 14.

**Výsledky:** U obou pacientů byly genetickým vyšetřením prokázány rozdílné aberace, které jsou dle literatury spojovány s vyšším rizikem rekurence a progresu u atypického a anaplastického meningeomu. Přitom mutace genu NF2 na chromozomu 22q dle literatury nehraje žádnou roli v progresi meningeomů.

**Závěr:** Genetické vyšetření může u nádorů zjistit genetické změny asociované s horší prognózou nebo s vyšším gradem nádoru než je histologicky klasifikován. V obou našich případech byla splněna kritéria špatné prognózy, přesto ani pro jeden neplatí maximum výskytu v pozdějším věku a fatální průběh onemocnění s dobou přežití kratší než 2 roky.

### 5 | Mutace KRAS (G12S) u pacienta s NSCLC léčeného erlotinibem – kazuistika

Ondřej Fiala<sup>1</sup>, Miloš Pešek<sup>2</sup>, Jindřich Fínek<sup>1</sup>,  
Lucie Benešová<sup>3</sup>, Marek Minárik<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Onkologické a radioterapeutické odd.

LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup>Klinika TRN LF UK a FN Plzeň



<sup>3</sup>Centrum aplikované genomiky solidních nádorů (CEGES), Genomac výzkumný ústav, Praha

**Úvod:** Erlotinib je perorální reverzibilní inhibitor tyrozinkinázy receptoru pro epidermální růstový factor (EGFR), je užíván k léčbě pokročilého stadia NSCLC. Mutace genu KRAS se vyskytují cca u 15–25 % pacientů s NSCLC, nejčastěji u pacientů s adenokarcinomem a kuřáků. KRAS mutace jsou považovány za negativní prognostický faktor, ale co se týče významu těchto mutací pro predikci rezistence k EGFR-TKI, dosud nebylo dosaženo konsenzu. Byly publikovány práce, které prokázaly, že mutace KRAS predikují rezistenci k EGFR-TKI, na druhou stranu existují práce, které tuto hypotézu nepovrdily, včetně velkých klinických studií fáze III. Otázka významu specifického typu KRAS mutace pro predikci efektu EGFR-TKI léčby je v poslední době hojně diskutovaným tématem.

**Kazuistika:** 66letý pacient, kuřák s histologicky verifikovaným adenokarcinomem levé plic, centrální formy, s metastatickým postižením obou plic, T4N0M1, klinické stadium IV byl diagnostikován v březnu 2006. Genetické vyšetření odhalilo přítomnost mutace genu KRAS, typ G12S, nebyla prokázána mutace ani amplifikace genu EGFR. V 4/2006 byla zahájena léčba chemoterapií schématem gemcitabin/karboplatina, bylo podáno 6 cyklů, přičemž bylo celkově dosaženo parciální regrese nálezu. V 12/2006 byla zjištěna progresse onemocnění, následně v 1/2007 byla zahájena chemoterapie druhé linie schématem docetaxel/karboplatina, byly podány 4 cykly, při kterých bylo dosaženo mírné regrese nálezu, ale v 7/2007 došlo k další progresi onemocnění, následně bylo provedeno paliativní ozáření tumoru levé plic celkovou dávkou 30 Gy, čímž bylo dosaženo parciální regrese velikosti tumoru. V 2/2008 byla zjištěna další progresse velikosti tumoru a byla zahájena léčba erlotinibem. Dle kontrolního CT v 7/2008 byla zjištěna parciální regrese velikosti četných plicních metastáz. V 12/2008 si pacient začal stěžovat na bolesti břicha, které však nemusely přímo souviset s léčbou erlotinibem a následně se rozhodl na vlastní žádost léčbu ukončit. V 2/2009 došlo k mírné progresi nálezu na skiagramu a během následujících kontrol nález pozvolna dále progredoval a v 11/2010 pacient zemřel.

**Závěr:** Autoři předkládají kazuistiku pacienta s metastatickým stadiem NSCLC, u kterého byla prokázána mutace genu KRAS (G12S), a přesto se u něj podařilo léčbou erlotinibem dosáhnout parciální regrese nálezu, celková délka přežití bez progresse činila 12 měsíců.

## 6 | Význam EGFR amplifikace u pacientů s NSCLC, nositelů wild-type EGFR genu, léčených EGFR-TKI

Ondřej Fiala<sup>1</sup>, Miloš Pešek<sup>2</sup>, Jindřich Fínek<sup>1</sup>, Lucie Benešová<sup>3</sup>, Zbyněk Bortlíček<sup>4</sup>, Marek Minářík<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Onkologické a radioterapeutické odd. LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup>Klinika TRN LF UK a FN Plzeň

<sup>3</sup>Centrum aplikované genomiky solidních nádorů (CEGES), Genomac výzkumný ústav, Praha

<sup>4</sup>Institut biostatistiky a analýz MU, Brno

**Úvod:** Léčba nízkomolekulárními inhibitory EGFR tyrosinkináz (EGFR-TKI) představuje jednu z moderních možností léčby pacientů s pokročilým stadiem NSCLC. V minulosti bylo prokázáno, že aktivační mutace genu EGFR predikují dobrý efekt této cílené léčby a v současné době se jedná o jediný molekulárně-genetický prediktor, který je v praxi využíván pro volbu léčby pacientů s pokročilým NSCLC. Výskyt EGFR mutací je v naší populaci relativně nízký, jsou prokazovány u cca 10–15 % pacientů s NSCLC. Z tohoto důvodu je hledání dalších prediktorů cílené léčby žádoucí. Význam amplifikace genu EGFR pro predikci efektu EGFR-TKI léčby není jednoznačně objasněn a byly publikovány práce, které prediktivní potenciál EGFR amplifikací potvrdily i takové, které jejich význam vyvracejí.

**Cíle:** Zhodnocení významu amplifikace genu EGFR pro predikci efektu léčby EGFR-TKI u pacientů s pokročilým stadiem NSCLC, kteří jsou nositeli wild-type EGFR genu.

**Metody:** Soubor pacientů čítá celkem 163 pacientů s pokročilým stadiem NSCLC (IIIB, IV), kteří jsou nositeli wild-type EGFR genu a byli léčeni EGFR-TKI (erlotinib, gefitinib), 100 mužů, 63 žen, 131 kuřáků, 30 nekuřáků, 93 pacientů s adenokarcinomem, 70 pacientů se skvamocelulárním karcinomem, 12 pacientů s jiným typem NSCLC, 157 pacientů léčených erlotinibem a 6 pacientů léčených gefitinibem. Genetické testování přítomnosti mutace genu EGFR (delece na exonu 19 a bodové mutace na exonu 21) bylo provedeno standardní metodou PCR, testování na přítomnost amplifikace genu EGFR bylo provedeno metodou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Pro statistické srovnání přežití pacientů byl užit log rank test.

**Výsledky:** Amplifikace genu EGFR byla prokázána u 18 pacientů (11 %). PFS u pacientů s amplifikací genu EGFR bylo 2,1 vs. 1,9 měsíce u pacientů bez EGFR amplifikace ( $p=0,172$ ). OS u pacientů s amplifikací genu EGFR bylo 13,6 vs. 9,8 měsíce u pacientů bez amplifikace genu

EGFR ( $p=0,737$ ). V podskupině pacientů s adenokarcinomem bylo PFS u pacientů s amplifikací genu EGFR 2,1 vs. 1,9 měsíce u pacientů bez EGFR amplifikace ( $p=0,2$ ) a OS u pacientů s amplifikací genu EGFR bylo 13,6 vs. 9,8 měsíce u pacientů bez EGFR amplifikace ( $p=0,921$ ).

**Závěr:** Výsledky provedené analýzy neprokázaly významný rozdíl efektu léčby EGFR-TKI v závislosti na přítomnosti amplifikace genu EGFR u selektované populace pacientů s NSCLC, kteří jsou nositeli wild-type EGFR genu. Amplifikace genu EGFR, detekovaná pomocí MLPA, není vhodným biomarkerem, který by bylo možné užít pro predikci efektu léčby EGFR-TKI u predominantní skupiny pacientů s NSCLC.

## 7 | Chromium exposure and Lung Cancer Development

Erika Halašová, Elena Kavcová, Tatiana Matáková, Anton Šingliar, Dušan Dobrota

Ústav lékařské biologie JLF UK, Martin

Increase of frequency of lung cancer in workers chronically exposed to hexavalent chromium is unequivocal. In 1980 the International Agency for Research on Cancer (IARC) identified chromium and some of its compounds as human carcinogens. It is generally accepted that cigarette smoking plays an important role in carcinogenesis of bronchopulmonary tract as well. Based on these facts, our study investigates incidence of lung cancer, its types, age of onset of the disease and surviving time among chromium exposed workers (smelters, tapers, crane operators) in comparison to non-exposed persons with accent to smoking habits.

Seventy seven chromium exposed workers and one hundred and four male controls with diagnosed lung cancer were analysed. The average exposure time among workers was 18.38 years (range 1–41 years).

Chromium exposure decreases the age at the onset of the disease of 4.18 years (65.51 years in control; 61.33 years in exposed group). Significant difference between the age at the onset of the disease was found between smokers (65.1 years) and non-smokers (68.6 years) ( $P=0.008$ ) in the control group. Non-exposed non-smokers had explicitly higher age at the onset of the illness in relation to other groups. In exposed group the significant effect of smoking on the age at the diseases onset was not found ( $P=0.775$ ). Small cell lung carcinoma (SCLC) forms 25.71 % of all cases in chromium exposed workers and 16.34 % in non exposed individuals. The survival time of patients with NSCLC and

SCLC within non-exposed were 12.33 and 17.75 month respectively and in exposed group 14.8 and 4.44 month respectively. No correlation was found between the age at the diseases onset and time of exposure.

Occupational exposure to chromium was identified as an important risk factor of lung cancer even overlaying effect of smoking. Both chromium exposure and smoking decrease the age at the diseases onset. Higher percentage of SCLC was found in chromium exposed individuals.

*This work was supported by Ministry of Health of the Slovak Republic, Grant No. 2007/48-UK-13 and Ministry of Education of the Slovak Republic, Grant APVV-0412-11.*

## 8| Analýza vybraných mikroRNA ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám karcinomu jícnu

Renata Héžová<sup>1,2</sup>, Alena Kovaříková<sup>2</sup>, Josef Srovnal<sup>3</sup>, Jiří Ehrmann<sup>3</sup>, Mariánx Hajdúch<sup>3</sup>, Tomáš Haruštiak<sup>4</sup>, Milada Zemanová<sup>5</sup>, Ondřej Slabý<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>CEITEC MU, Masarykova Univerzita, Brno  
<sup>2</sup>Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

<sup>3</sup>Ústav molekulární a translační medicíny, Univerzita Palackého, Olomouc

<sup>4</sup>III. Chirurgická klinika, FN Motol, Praha

<sup>5</sup>Onkologická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha

Ezofageální karcinom je celosvětově osmým nejběžnějším maligním onemocněním a šestou nejčastější příčinou úmrtí v důsledku nádorového onemocnění. Jeho incidence v populaci neustále narůstá a pacienti mají velmi špatnou prognózu. S tím souvisí i skutečnost, že dosud nebyly podrobně popsány spolehlivé biomarkery zapojené do klíčových signálních drah, které vedou k rozvoji karcinomu jícnu, což by napomohlo zlepšit jeho včasnou diagnostiku a upřesnit prognózu. V nedávné době mnohé studie ukázaly, že velmi důležitou roli v maligní transformaci hrají krátké nekódující molekuly mikroRNA (miRNA), které se podílí na regulaci mnoha buněčných procesů.

V této práci jsme analyzovali expresi 10ti vybraných miRNA v nádorové tkáni 45 pacientů s karcinomem jícnu. Cílem práce bylo porovnat expresi těchto molekul v nádorové a nenádorové tkáni, zjistit specifitu studovaných miRNA pro daný histologický typ a hledat možné korelace mezi expresí a odpovědí na podávanou neadjuvantní léčbu. Soubor vzorků zahrnoval nejvýznamnější histologické typy jako je spi-

nocelulární karcinom (SCCE) (n=22), adenokarcinom (EAC) (n=23) a kontrolní zdravou tkáň (n=21). Metodou qRT-PCR jsme ve vzorcích RNA z chirurgicky odebraných tkání stanovili následující miRNA: miR-203, miR-205, miR-25, miR-148a, miR-29c, miR-21, miR-200c, miR-27a, miR-31 a let-7a. Analytický systém zahrnoval fluorescenčně značené TaqMan sondy firmy Applied Biosystems. Výsledné exprese analyzovaných miRNA jsme normalizovali podle endogenní kontroly, krátké jaderné RNA (RNU44). Pozorovali jsme, že výraznému pokles hladin miR-203 (p < 0,0001), miR-205 (p = 0,0006), miR-148 (p = 0,0034), a zvýšené hladiny miR-21 (p = 0,0076) v nádorové tkáni. Při analýze hladin studovaných miRNA u obou histologických typu, jsme identifikovali signifikantně vyšší expresi miR-148a (p = 0,0042) a významně sníženou expresi miR-205 (p = 0,0001) u EAC v porovnání s SCCE. Dále jsme pozorovali významně vyšší hladiny miR-29c (p=0.0006) v nádorové tkáni pacientů, kteří neodpovídali na neadjuvantní chemoradioterapii (PD). Výsledky naší pilotní studie potvrzují některá dřívější pozorování a svědčí pro možné klinické využití miRNA jako diagnostických a prediktivních biomarkerů u pacientů s karcinomem jícnu.

*Tato práce byla podpořena grantem Interní Grantové Agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky NT/13585.*

## 9| Využití hmotnostně spektrometrických metod pro analýzu biomarkerů v biologickém materiálu

Dušan Holub<sup>1</sup>, Jiří Houda<sup>2</sup>, Petr Džubák<sup>1</sup>, Lucie Sulovská<sup>2</sup>, Dagmar Pospíšilová<sup>2</sup>, Marián Hajdúch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř experimentální medicíny, Institut molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc

<sup>2</sup>Dětská klinika, LF UP a FN Olomouc

Hmotnostní spektrometrie je moderní analytická metoda, která zažívá v posledních letech dramatický rozvoj a postupně se dostává do oblasti klinické diagnostiky u řady onemocnění. S novými přístroji vzrostla citlivost měření, kdy se dostáváme na detekční limity doposud používaných metod, jako je ELISA či western blott. Jedním z nejnovějších přístupů je monitorování vybraných molekul v komplexním vzorku, kdy hovoříme o tzv. single reaction monitoringu (SRM). Význam této metody chceme demonstrovat na případu nativního peptidového hormonu hepcidinu, který se podílí na homeostáze železa v lidském organismu a je jedním z potenciálních

markerů pro diferenciaci různých poruch metabolismu železa.

Díky složitě terciální struktuře neexistují spolehlivé protilátky pro jeho detekci a nejsou dostupné spolehlivé a validované metody pro stanovení hladiny hepcidinu v lidském séru pro rutinní použití. Mimo jiné jeho koncentrace v biologickém materiálu se pohybuje v širokém rozmezí cca 2,5–600 ng/ml. Metoda, kterou jsme vyvinuli, využívá jednostupňovou adsorpci hepcidinu na pevné fázi. Následná separace extraktu probíhá na koloně s reverzní fázi C18 pomocí kapalinové chromatografie. Hladina hepcidinu je detekována díky SRM na citlivém hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem.

Výhodou této metody ve srovnání s ELISA metodami je časová nenáročnost, možnost automatizace metody a vysoká specifita.

Zavedení standardizovaného vyšetření hepcidinu může významně zlepšit a upřesnit diagnostiku metabolických poruch Fe.

Mimo jiné tento modelový případ ilustruje potenciál současných proteomických metod v monitorování biomarkerů a potenciálně i onkomarkerů v diagnostice.

*Tento projekt byl podpořen z interního grantu LF UP (LF\_2012\_018), infrastrukturní část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena z operačního programu VaVpI (CZ.1.05/2.1.00/01.0030).*

## 10| Hladiny miR-210 v nádorové tkáni a funkční efekty jejího utlumení na buňky renálního karcinomu

Robert Iliev<sup>2</sup>, Martina Redová<sup>1,2</sup>, Alexandr Poprach<sup>1</sup>, Andrej Bešše<sup>2</sup>, Kateřina Kantorová<sup>2</sup>, Jana Nekvindová<sup>3</sup>, Radek Lakomý<sup>1</sup>, Lenka Radová<sup>4</sup>, Marek Svoboda<sup>1</sup>, Rostislav Vyzula<sup>1</sup>, Ondřej Slabý<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno

<sup>3</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Fakultní nemocnice v Hradci Králové

<sup>4</sup>Ústav molekulární a translační medicíny, Univerzita Palackého, Olomouc

Renální karcinom (RCC) je nejčastější nádorové onemocnění ledvin v dospělém věku čítající asi 3 % dospělých malignit. MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující jednovláknové RNA, které regulují genovou expresi na post-transkripční

úrovni. Za použití qRT-PCR TaqMan low density array (TLDA) jsme analyzovali globální expresní profily miRNA u RCC a u nenádorového renálního parenchymu. Získaná data byla normalizována (RNU48, RNU6B) a poté statisticky vyhodnocena v prostředí statistického jazyka R pomocí programu Bioconductor v kombinaci s hierarchickým klastrováním. Získaná data jsme dále validovali na nezávislém souboru pacientů s RCC (35 RCC vs 10 vzorků nenádorového parenchymu). *In vitro* experimenty byly prováděny na buněčných liniích renálního karcinomu ACHN a CAKI-2, kde jsme analyzovali vliv transkripce anti-miR-210 na životaschopnost buněk, apoptózu, buněčný cyklus, migraci a invazivitu. Pomocí analýzy expresních profilů 667 miRNA získaných metodou kvantitativní Real-Time PCR arrays jsme identifikovali zvýšenou expresi miR-210 v nádorové tkáni ( $p=0.0008$ ). Na nezávislém souboru jsme toto pozorování potvrdili ( $p < 0.0001$ ). *In vitro* jsme po experimentálním snížení hladiny miR-210 v ACHN a CAKI-2 buněčné linii pozorovali sníženou životaschopnost buněk a buněčné linie CAKI-2 hromadění buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Po snížení exprese miR-210 jsme pozorovali také sníženou schopnost migrace a snížený invazivní potenciál buněčné linie ACHN odvozené z metastatického renálního adenokarcinomu. Prokázali jsme také sníženou expresi proteinu HIF1 $\alpha$  v obou buněčných liniích po umlčení miR-210, což naznačuje účast miR-210 v regulaci hypoxických procesů u RCC, nejen prostřednictvím regulace svých cílových mRNA, ale také nepřímo pomocí regulace HIF1 $\alpha$ . V současnosti se jedná o první důkaz naznačující, že miR-210 má schopnost jak regulovat buněčnou migraci a invazivní potenciál, tak i hladinu proteinu HIF1 $\alpha$  v buňkách RCC. Zvýšená exprese miR-210 byla již zjištěna u různých typů nádorů, což poukazuje na její zapojení do obecných procesů maligní transformace a vytváří předpoklad, že může být v budoucnu využita jako terapeutický cíl v léčbě nádorových onemocnění.

*Práce byla podpořena grantem IGA MZČR IGA NT/13547.*

### 11| Srovnání profilu zinkových proteinů v buňkách karcinomu prostaty vystavených působení Zn (II)

Eva Jílková<sup>1</sup>, Michal Masařík<sup>2</sup>,  
Kristýna Šmerková<sup>1</sup>, Renata Kenšová<sup>1</sup>,  
Markéta Sztalmachová<sup>1,2</sup>,  
Simona Dostálová<sup>1</sup>, Soňa Křížková<sup>1,4</sup>,  
Tomáš Eckschlager<sup>3</sup>, Vojtěch Adam<sup>1,4</sup>,  
René Kizek<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno

<sup>3</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie, II. LF UK, Praha

<sup>4</sup>Středoevropský technologický institut, VUT, Brno

Nádory prostaty patří mezi nejčastější nádorová onemocnění u mužů a také se řadí na druhé místo co se týká souvislosti nádorového onemocnění a úmrtí. Z nových studií, které se zabývaly hledáním nových markerů, které vedou ke včasné diagnostice rakoviny prostaty, bylo opakovaně prokázáno, že rakovinné buňky prostaty mají změněnou schopnost příjmu a akumulace zinkových iontů v porovnání se zdravými prostatickými buňkami (1).

Zinek patří k prvkům s výraznou biologickou aktivitou. Tento prvek je důležitou esenciální živinou a je nezbytnou strukturní, katalytickou, ko-katalytickou složkou celé řady proteinů. Ve zdravé prostatické tkáni hraje zinek důležitou roli v proliferaci, diferenciaci, regulaci a apoptózy buněk. Intracelulární zinek je ve zdravé i nádorové prostatické tkáni chelátován četnými proteiny (nukleoproteiny, metaloenzymy, metaloproteiny a metalothioneiny). Laterální lalok je také hlavním místem počátku rakovinného bujení a je charakteristický ztrátou akumulace zinku. U pacientů s karcinomem prostaty byl prokázán nižší obsah zinku v buňkách laterálního laloku. Bylo také zjištěno, že u pacientů s karcinomem prostaty jsou v buňkách laterálního laloku tohoto orgánu hladiny zinku signifikantně nižší oproti normálním hodnotám (2).

Cílem této práce bylo srovnání elektroforetických profilů zinkových proteinů v prostatických buněčných liniích PC-3, LNCaP a PNT1A vystavených působení 0. 25 a 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ . Za tímto účelem byla vyvinuta automatizovaná metoda izolace zinek vázajících proteinů pomocí paramagnetických částic modifikovaných protilátkou rozeznávající zinek (3). Obsah zinku v buňkách byl stanoven pomocí diferenční pulsní voltametrie. Bylo zjištěno, že v případě kultivace v 0  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  je ve srovnání s kontrolní linií PNT1A obsah zinkových proteinů v nádorové linii PC-3 odvozené z metastatického místa v kosti 30 % a 80 % u linie LNCaP odvozené z metastatického místa v levé supraklavikulární uzlině. Zatímco v případě kultivace v přítomnosti 25  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  množství izolovaných zinkových proteinů a koncentrace Zn (II) ve všech liniích vzrostly, a to o 50 % u linie PC-3, o 70 % u linie LNCaP a o 22 % u linie PNT1A ve srovnání s kultivací v médiu bez přísady  $\text{ZnCl}_2$ , v případě kultivace v přítomnosti

50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  byl nárůst 80 % u linie PC-3, 75 % u linie LNCaP a 36 % u linie PNT1A. Tyto výsledky naznačují, že u nádorových linií prostaty je dysregulován příjem zinku a dochází k jeho zvýšené chelataci pomocí intracelulárních proteinů

*Tato práce byla podpořena granty IGA TP 6/2012, CYTORES GAČR P301/10/0356 a NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068.*

1. Krízková S, et al. Metallothioneins and zinc in cancer diagnosis and therapy. *Drug Metab. Rev.*, 2012. in press.

2. Gumulec J, et al. Insight to physiology and pathology of zinc (II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. *Curr. Med. Chem.*, 2011; 18(33): 5041–5051.

3. Krízková S, et al., Immunoextraction of zinc proteins from human plasma using chicken yolk antibodies immobilized onto paramagnetic particles and their electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 2012; 33(12): 1824–1832.

### 12| miR-205 jako prognostický marker u triple-negativního karcinomu prsu

Jaroslav Juráček<sup>1</sup>, Renata Héžová<sup>1,2</sup>,  
Rostislav Vyzula<sup>2</sup>, Ondřej Slabý<sup>1,2</sup>,  
Marek Svoboda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CEITEC MU, Masarykova Univerzita, Brno

<sup>2</sup>Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

Karcinom prsu je v současné době nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním u žen nejen v České republice, ale i celosvětově. Významným podtypem tohoto onemocnění, který se vyznačuje obzvláště nepříznivou prognózou a vysokou agresivitou, je tzv. triple-negativní karcinom prsu (TNBC – triple negative breast cancer). U TNBC nádorové buňky neexprimují na svém povrchu žádné diagnosticky a léčebně významné receptory (ER, PR, HER2), proto terapeutické postupy založené na podávání monoklonálních protilátek nejsou v tomto případě vhodné. Tato skutečnost dává prostor jiným biomolekulám, jako jsou mikroRNA, které ovlivňují i značné množství genů zapojených do karcinogeneze.

Cílem studie bylo nalézt mikroRNA (miRNA), které mají pro pacientky s TNBC prognostický význam. U 47 pacientek jsme pomocí metody Real-Time PCR studovali hladiny exprese sedmi vybraných miRNA (miR-205, miR-99, miR-505, miR-125b, miR-187, miR-146, miR-24–2). Zjistili jsme, že zvýšená hladina miR-205 ( $p=0.013$ ) je spojena s delším bezpříznakovým přežíváním, a zvýšená exprese miR-205 ( $p=0.035$ ) a miR-505 ( $p=0.039$ ) potom s delším celkovým přežíváním těchto pacientek.

Domníváme se, že zejména miR-205 nebo proteiny, jež reguluje, bude možné po dalších nezávislých validacích využít jako potenciální



prognostické biomarkery tohoto vysoce maligního nádorového onemocnění.

*Tato práce byla podpořena Institucionálními zdroji pro Podporu výzkumných organizací poskytnutou Ministerstvem zdravotnictví České republiky v roce 2012.*

### 13| Androgen depletion induces neuroendocrine differentiation and senescence-associated secretory phenotype in prostate cancer

Gvantsa Kharashvili<sup>1</sup>, Zuzana Pernicová<sup>2</sup>, Eva Slabáková<sup>2</sup>, Karel Souček<sup>2</sup>, Jan Bouchal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Pathology and Department of Clinical and Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University, Olomouc

<sup>2</sup>Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, Brno

**Background:** Androgen deprivation therapy (ADT) is an important treatment for advanced stage prostate cancer, however, treated tumors relapse to incurable androgen-independent prostate cancer. The aim of the present study was to investigate whether androgen depletion induces senescence and neuroendocrine differentiation (NED) and modulate tissue environment in prostate cancer.

**Material and methods:** Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) prostate tumor samples were obtained between 1998 and 2003 years. Ten patients had both fine-needle biopsies (before neoadjuvant ADT) and prostatectomies (after neoadjuvant ADT). Six untreated control prostatectomies were randomly selected. Samples were immunostained with  $\gamma$ -enolase, chromogranin A and vimentin antibodies. Specimens were assessed semiquantitatively by histoscore and statistically processed. For dual immunofluorescence and confocal microscopy, prostate cancer FFPE sections were incubated with primary ( $\gamma$ -enolase and vimentin) and secondary fluorescently labeled antibodies. This tissue analysis complemented in vitro results on effects of ADT which were performed at the Institute of Biophysics and had been jointly published (Pernicova et al. Neoplasia 2011; 13: 526–536).

**Results:** Long term androgen depletion in LNCaP and LAPC4 cells induced senescence-associated secretory phenotype (assessed by  $\beta$ -galactosidase activity, IGFBP3 and cathepsin B) and NED ( $\gamma$ -enolase and tubulin  $\beta$ -III). Vimentin was also strongly induced in prostate cancer cells by androgen depletion. Because the ex-

pression of both N-cadherin and E-cadherin was unaffected by androgen depletion, the NE-like cells were unlikely to be undergoing an EMT, but vimentin was rather indicative of senescence. We wanted to know if induction of vimentin and NED also occurred in human prostate tumors following ADT and examined samples of human prostate cancers collected pre- and/or post-neoadjuvant ADT. Prior to ADT, expression of vimentin, chromogranin A and  $\gamma$ -enolase in epithelial cells of the prostate tumor samples were either undetectable or at low levels. Following ADT, expression of all three markers was significantly increased in epithelial cells in samples from the same individuals. In contrast, vimentin expression in stromal cells of the prostate was unaffected by ADT. Using dual color immunostaining and confocal microscopy, we found that vimentin was colocalized with  $\gamma$ -enolase in some NE-like cells.

**Conclusions:** We have shown that ADT induced neuroendocrine differentiation and senescence both in vitro and in prostate cancer samples. Although the induction of senescence in cancer cells is a potent mechanism of tumor suppression, senescent cells remain metabolically active and may secrete a broad spectrum of factors that promote tumorigenicity in neighboring malignant cells, leading to the failure of ADT and progression of the disease to androgen-independence.

*Acknowledgements: Supported by EU infrastructure support CZ.1.05/2.1.00/01.0030 and LF\_2012\_019.*

### 14| Expres nestinu i v nádorových buňkách hematologických malignit – leukemií a lymfomů

Tomáš Loja<sup>1,2</sup>, Marek Borský;  
Tomáš Bernard; Michael Doubek

<sup>1</sup>Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut – CEITEC, Masarykova univerzita, Brno

Protein nestin je obecně považován za marker nezralých (kmenových a progenitorových) buněk a jeho exprese je výrazná především v průběhu savčí embryogeneze. Jeho re-exprese nastává za různých patologických podmínek a jednou z nich je neoplastická transformace. Nestin byl doposud detekován u celé škály solidních nádorů, kde míra jeho exprese koreluje s malignitou a invazivitou. Obecně se tedy považuje za negativní prognostický faktor. Některé nestin-pozitivní populace nádorových buněk

navíc vykazují znaky nádorových kmenových buněk (CSCs), které jsou podle hypotézy CSCs zodpovědné za relaps onemocnění.

Naše pilotní data odhalila přítomnost nestinu v buňkách nádorových linií derivovaných z celé řady hematologických malignit, včetně nejčastějšího typu leukemie dospělého věku v ČR i v celém západním světě, chronické lymfocytární leukemie (CLL). CLL je lymfoproliferativní onemocnění, jehož podstatou je klonální proliferace maligních B lymfocytů, které se vyznačují nekontrolovanou proliferací a poruchou apoptózy. Celá skupina lymfoproliferativních onemocnění a zejména CLL se vyznačuje velice variabilním průběhem a prognózou. Stanovení prognostických faktorů je důležitou součástí vyšetření. Z těchto důvodů se pozornost výzkumu obrací k hledání dalších markerů, které by pomohly ke zpřesnění stanovení prognózy pacienta a umožnily tak lépe optimalizovat jeho léčbu.

Detekce nestinu by mohla být nápomocná při vyhodnocování biologického chování nádoru, mohla by ve svém důsledku vést ke zlepšení stratifikace, zpřesnění prognózy a volbě vhodné léčebné strategie. Nestin by tak mohl rozšířit skupinu prognostických markerů jak u CLL, tak případně i dalších hematologických malignit.

### 15| Korelace prognostických markerů LAG3, LPL a ZAP70 s mutačním stavem IGHV pacientů s chronickou lymfocytární leukemií

Hana Mádrová<sup>1,2</sup>; Hana Shuhrová Francová<sup>2</sup>; Karla Plevová<sup>1,2</sup>; Zuzana Jurčíčková<sup>3</sup>; Jana Kotašková<sup>1,2</sup>; Antonín Libra<sup>3</sup>; Martin Buček<sup>3</sup>; Boris Tichý<sup>1,2</sup>; Šárka Pospíšilová<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Středoevropský technologický institut (CEITEC, Masarykova univerzita, Brno)

<sup>2</sup>Fakultní nemocnice Brno

<sup>3</sup>Generi Biotech s. r. o.

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je velmi heterogenní onemocnění. Pacienty lze rozdělit do dvou prognosticky odlišných skupin na základě mutačního stavu těžkého řetězce variabilního segmentu imunoglobulinového genu (IGHV). CLL u pacientů s mutovaným IGHV progreduje pomaleji než u pacientů s nemutovaným IGHV. S mutačním stavem IGHV koreluje exprese různých genů, např. LAG3, LPL a ZAP70. Tyto geny by bylo možné v budoucnu využít jako zástupné markery pro mutační stav IGHV. Stanovit jejich expresi je jednodušší a rychlejší, než určit mutační stav IGHV přímo pomocí sekvenování.

Ověřovali jsme rozdíl v expresi LAG3, LPL a ZAP70 u 118 pacientů s CLL (58 s mutovaným IGHV, 60 s nemutovaným IGHV). Expresie byla testována na RNA B-lymfocytů separovaných z periferní krve. Rozdíly v genové expresi (normalizované vůči expresi referenčních genů B2M, HPRT a GUSB) byly hodnoceny Mann-Whitney U testem a byly statisticky významné pro všechny tři geny ( $p > 0,000\ 001$ ).

LPL je exprimován v maligních B-lymfocytech. ZAP70 a LAG3 jsou exprimovány v maligních B-lymfocytech, tak i v T-lymfocytech. Obsah T-lymfocytů ve vzorku je závislý na způsobu zpracování materiálu. Pro využití exprese LAG3, LPL a ZAP70 v prognostice je proto nutné zhodnotit vliv případných T-lymfocytů ve vzorku. Přítomnost T-lymfocytární RNA by mohla nespecificky zvýšit celkovou detekovanou expresi ZAP70 a LAG3 a tím ovlivnit výsledek.

Pro zhodnocení vlivu T-lymfocytů jsme zpracovávali periferní krev 10 pacientů (5 s mutovaným IGHV, 5 s nemutovaným IGHV) třemi různými způsoby (osmolýza, gradientová centrifugace, gradientová centrifugace s deplecí T-lymfocytů). Poté jsme porovnávali normalizovanou expresi LAG3, LPL a ZAP70 ve vzorcích obsahujících T-lymfocytární RNA (osmolýza, gradientová centrifugace) a ve vzorcích neobsahujících T-lymfocytární RNA (gradientová centrifugace s deplecí T-lymfocytů). Rozdíly byly hodnoceny Znaménkovým testem. Rozdíly v normalizované expresi LPL ani LAG3 nebyly statisticky významné. Normalizovaná exprese ZAP70 vzorků zpracovaných osmolýzou a vzorků zpracovaných gradientovou centrifugací s deplecí T-lymfocytů se lišila ( $p = 0,005$ ). Rozdíl exprese ZAP70 mezi vzorky zpracovanými gradientovou centrifugací a gradientovou centrifugací s deplecí T-lymfocytů nebyl statisticky významný. Pro případné využití v prognostice by bylo nutné potvrdit, zda rozdíl v expresi ZAP70 nemá vliv na výsledek analýzy, popř. zhodnotit, od jakého zastoupení T-lymfocytů může být výsledek zkreslený.

*Výzkum byl podpořen granty: MPO FR-TI2/254, SuPReMMe CZ.1.07/2.3.00/200.0045, CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068, MUNI/A/0784/2011.*

## 16| Význam hypoxie a HIF-1 $\alpha$ pro vznik chemorezistence u buněčných linií odvozených od lidského neuroblastomu

Helena Maříková, Jan Hraběta, Tomáš Groh, Mohamed Abdel Rahman, Šimon Cipro, Tomáš Eckschlager  
Klinika dětské hematologie a onkologie UK  
2. LF a FN Motol, Praha

Hypoxie je charakteristickým znakem mikroprostředí solidních nádorů. Adaptace nádorových buněk na hypoxické podmínky má řadu významných biologických dopadů, podílí se na agresivnějším chování nádorů, jejich dediferenciaci a je jednou z příčin snížení apoptózy indukované cytostatiky a zvýšení genetické nestability nádorových buněk. Hlavním faktorem, který adaptaci na hypoxické prostředí ovlivňuje, je hypoxií indukovaný transkripční faktor (HIF). Je tvořen dvěma podjednotkami, konstitutivně exprimovanou HIF-1 $\beta$ /ARNT a hypoxií indukovanou HIF-1 $\alpha$  s homology HIF-2 $\alpha$  a HIF-3 $\alpha$ . Za snížené tenze kyslíku je HIF-1 $\alpha$  podjednotka stabilizována, heterodimerizuje s HIF-1 $\beta$ /ARNT a tento dimer je následně translokován do jádra. Stabilizovaný heterodimer transaktivuje více než 100 genů, které zprostředkovávají adaptivní odpověď nádorových buněk na hypoxii. Mezi tyto geny patří například gen pro vaskulární endotelální růstový faktor (VEGF), erythropoetin (EPO) a glukózový transporter 1 (SLC2A1). Pochopení regulačních mechanismů HIF-1 $\alpha$  proto může mít velký význam při vývoji léčby zhoubných nádorů.

V této studii jsme se zaměřili na sledování dynamiky exprese HIF-1 $\alpha$  v průběhu kultivace v hypoxii (1% O<sub>2</sub>) a v normoxii (21% O<sub>2</sub>) u pěti buněčných linií lidského neuroblastomu (SK-N-AS, UKF-NB-4, UKF-NB-3, SH-SY5Y a IMR-32). Ukázalo se, že námi studované linie exprimují HIF-1 $\alpha$  i v normoxii. Pro sledování vlivu HIF-1 $\alpha$  na biologické vlastnosti buněk lidského neuroblastomu (NBL) jsme inhibovali aktivitu HIF-1 $\alpha$  pomocí nízkomolekulárních inhibitorů chetominu, YC-1 a LW6. Zavedli jsme také metodu silencingu genu HIF-1 $\alpha$  pomocí siRNA u buněčné linie SK-N-AS. Následně vytvoříme pomocí shRNA stabilní buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-4 s utlumenou expresí HIF-1 $\alpha$  a pokusíme se i o transfekci ostatních NBL linií. U studovaných NBL linií jsme v hypoxii pozorovali rezistenci na cytostatika cisplatinu a elipticin a prokázali jsme, že inhibicí HIF-1 $\alpha$  je možné tuto rezistenci hypoxických nádorových buněk k cytostatikům snížit.

## 17| Genetic variability in the MTHFR and ACE genes and colorectal cancer risk in Slovak population

Tatiana Matáková, Erika Halašová, Anton Dzian, Edward Hufo, Mária Škereňová  
Ústav lekárskej biológie JLF UK, Martin

**Introduction:** We study gene variants in the methylenetetrahydrofolate reductase

gene (MTHFR 677 polymorphism, (rs1801133) and MTHFR 1298 polymorphism (rs1801131)) and in the angiotensin-converting enzyme gene (ACE D/I polymorphism, rs1799752). MTHFR plays a key role in folate metabolism by channeling one-carbon units between nucleotide synthesis and methylation reactions. Severe enzyme deficiency leads to hyperhomocysteinemia and homocystinuria, with altered folate distribution. Mutations in the MTHFR gene lead to reduced MTHFR enzyme activity, which increases intracellular folate metabolites and may increase the rate of activity of thymidylate synthase. ACE, a key enzyme in the renin-angiotensin system, plays the important roles of regulating of blood pressure and serum electrolytes. It is differentially expressed in several carcinomas and may affect tumor cell proliferation, migration, angiogenesis, and metastatic behavior. Inhibition of ACE activity suppresses tumor growth and angiogenesis in vitro and vivo of animal models; moreover, epidemiologic studies have also indicated that ACE inhibitors might decrease the risk and mortality rate of cancers. In the light of the established association of ACE with several types of cancer, the possible contribution of the insertion/deletion (I/D) polymorphism that affects ACE gene expression, in the development of colorectal cancer was investigated.

**Material and methods:** DNA samples of 330 healthy controls and 231 patients with colorectal cancer (adenocarcinomas) were examined by allele-specific PCR reaction for ACE polymorphism and RLFP for MTHFR polymorphisms followed by electrophoretic analysis. Minor allele frequency was estimated from genotype data from unrelated population-based controls. Pairwise linkage disequilibrium between SNPs was estimated using the square of the correlation coefficient between markers. In the analysis of main effects, the population and clinic-based data were analyzed separately. We used multivariable conditional logistic regression with sibship as the matching factor to estimate main effects and stratum-specific odds ratios (OR). We controlled for age and sex in all analyses.

**Results:** Frequency of the minor allele (Val) was significant lower ( $p=0.01$ ) in control group of women. Frequency of homozygous variants genotype MTHFR (V/V) was lower among cases in women (5,4%) than control women (9,8%). No significant association was found between the I/D polymorphism and over all cancer risks (OR = 0.87).

**Conclusion:** Our results in this time suggest that the D/I polymorphism in ACE gene may not contribute to susceptibility to colorectal



cancer. A common polymorphism in a folate-metabolizing gene, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C > T has been associated with reduced risk of colorectal cancer.

*This work was supported by Ministry of Education of the Slovak Republic, Grant APVV-0412-11.*

## 18| Expresie N-terminálních izoform proteinu p73 v buněčných liniích derivovaných z neurogenických nádorů s aberantním počtem centrozomů

Erika Mikulenková<sup>1</sup>, Jakub Neradil<sup>1,2</sup>, Karel Zitterbart<sup>1,3</sup>, Jaroslav Štěrba<sup>2,3</sup>, Renata Veselská<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř nádorové biologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

<sup>2</sup>Masarykův onkologický ústav, Brno,

<sup>3</sup>Klinika dětské onkologie, LF MU a FN Brno

Protein p73 je transkripční faktor, který patří do rodiny nádorového supresoru p53. Předkládaná studie je zaměřena na detekci dvou N-terminálních izoform proteinu p73: TAp73 a deltaNp73. Izoforma TAp73 je spojována s kontrolou průběhu mitotického dělení a s udržováním genomické stability. Byly popsány poruchy mitózy, které jsou závislé na přítomnosti, resp. nepřítomnosti TAp73. Izoforma TAp73 má funkce nádorového supresoru, které však mohou být potlačeny izoformou deltaNp73. Dysfunkce proteinu p73, zejména izoformy TAp73, bývá spojena s mitotickými abnormalitami, které mohou vést k polyploidii a aneuploidii a přispět tak ke vzniku nádoru. Jednou z příčin mitotických abnormalit je amplifikace centrozomu, která vzniká deregulací duplikačního cyklu centrozomu. Hlavním cílem této studie bylo sledovat rozdíly v lokalizaci a expresi obou izoform proteinu p73 u jednotlivých linií a zjistit, zda rozdíly v expresi obou izoform p73 korelují s výskytem aberantního počtu centrozomů.

Ke studii byly využity celkem 4 buněčné linie, které byly derivovány z multiformního glioblastomu (HGG-02 a GM-7), meduloblastomu (Daoy) a neuroblastomu (SH-SY5Y). Hodnocení exprese sledovaných izoform proteinu p73 bylo provedeno pomocí imunodetekčních metod.

Výsledky prokázaly, že exprese a intracelulární lokalizace obou izoform se u jednotlivých linií liší. Byly zjištěny i významné rozdíly v četnosti buněk s abnormalitami v počtu centrozomů a s maximálním aberantním počtem centrosomů v buňce. Nejvyšší četnost buněk s aberantním počtem centrozomů byla dete-

kována u linie HGG-02 a současně u této linie byly zaznamenány nejvyšší početní abnormality centrozomů. U této linie současně dominovala exprese izoformy deltaNp73, která vykazovala převážně cytoplazmatickou lokalizaci. U dalších třech linií byla četnost buněk s aberantním počtem centrozomů i početní abnormality výrazně nižší. Izoforma deltaNp73 byla u linií GM-7 a Daoy lokalizována převážně v jádře, kdežto u linie SH-SY5Y v cytoplazmě. Naproti tomu izoforma TAp73 byla u všech linií detekována v buněčném jádře.

Zjištěné výsledky naznačují, že extrémně vysoký počet buněk s aberacemi centrozomů u linie HGG-02 může mít spojitost s expresí a intracelulární lokalizací izoformy deltaNp73.

*Práce byla podpořena granty MUNI/C/0804/2011 a RECAMO.*

## 19| Cirkulující nádorové buňky u pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty jako součást individualizace systémové léčby

Veronika Mikulová<sup>1</sup>, Markéta Jančíková<sup>1</sup>, Otakar Čapoun<sup>2</sup>, Viktor Soukup<sup>2</sup>, Hana Honová<sup>3</sup>, Tomáš Hanuš<sup>2</sup>, Milada Šírová<sup>4</sup>, Tomáš Zima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř klinické imunologie a alergologie, ÚLBDL VFN a 1. LF UK v Praze

<sup>2</sup>Urologická klinika VFN a 1. LF UK v Praze

<sup>3</sup>Onkologická klinika VFN a 1. LF UK v Praze

<sup>4</sup>Laboratoř nádorové biologie, Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i

**Úvod:** Karcinom prostaty je v současné době v České republice druhým nejčastějším onkologickým onemocněním u mužů a zároveň nejčastějším zhoubným urologickým nádorem. Nejběžnější léčebnou modalitu po znovuoživení onemocnění představuje androgenní deprivace. Téměř 20 % pacientů v průběhu této léčby dospěje do fáze rezistentní na antiandrogenní léčbu i přes kastroční hodnoty testosteronu. Pacienti s kastročně rezistentním karcinomem prostaty (CRPC) mají špatnou prognózu onemocnění a až 85 % z nich umírá s metastatickým postižením skeletu. Cílem tohoto projektu je studium přítomnosti cirkulujících nádorových buněk (CTC) v periferní krvi pacientů s CRPC jako ukazatele metastatického procesu a zjištění účinnosti terapie na základě perzistenci či vymizení CTC z periferní krve.

**Metodika:** Z 5 ml periferní krve pacientů s CRPC a pacientů s benigní hyperplazií prostaty byla provedena imunomagnetická selekce CTC pomocí AdnaTest ProstateCancerSelect kitu (Adnagen, Langenhagen, Německo). Následně

z lyzátu obohacené frakce CTC byla izolována mRNA pomocí magnetických kuliček konjugovaných s oligo (dT) 25 za použití AdnaTest ProstateCancerDetect kitu. Reverzní transkripce byla připravena cDNA, která byla použita jako templát pro detekci CTC a jejich charakterizaci pomocí multiplex-PCR. Byla sledována amplifikace tumor asociovaných antigenů (PSMA, PSA, EGFR) a kontrolního genu aktinu. Výsledky amplifikace byly hodnoceny na přístroji Bioanalyzer 2100 (Agilent) za použití DNA 1000 LabChipů. V případě detekce nejméně jednoho ze sledovaných antigenů v koncentraci vyšší než 0,10 ng/ul byl výsledek považován jako pozitivní průkaz CTC. Periferní krev byla pacientům odebírána ve dvou časových bodech – před podáním chemoterapie a po ukončení 4. cyklu chemoterapie.

**Výsledky:** V období 12/2011 do 10/2012 bylo do studie zařazeno celkem 18 pacientů (16 pacientů s CRPC a 2 pacienti s benigní hyperplazií prostaty). U 10 pacientů byla provedena analýza CTC před a po 4. cyklu chemoterapie. U zbývajících 6 pacientů bylo zatím provedeno pouze vyšetření CTC před zahájením chemoterapie. CTC byly detekovány v periferní krvi 15 pacientů s CRPC před podáním chemoterapie. V CTC těchto pacientů byla sledována vysoká exprese PSA, která byla u více jak 50 % pacientů doprovázena zvýšenou expresí PSMA. Pouze CTC jednoho pacienta vykazovaly triple-pozitivitu na sledované markery (PSA, PSMA, EGFR). U pacientů s benigní hyperplazií prostaty nebyly CTC detekovány. Pacientům byl dále proveden 2. odběr periferní krve po 4. cyklu chemoterapie. U 30 % pacientů došlo k vymizení CTC po podání chemoterapie. 70 % pacientů bylo po 4. cyklu chemoterapie stále CTC pozitivních. Tato skupina pacientů bude dále sledována.

**Diskuze:** Naše současné výsledky naznačují, že téměř u všech pacientů s CRPC je možné před zahájením chemoterapie nalézt CTC. Navíc tyto CTC vykazují značnou heterogenitu v expresi sledovaných genů. Na základě porovnání vzorků pacientů s CRPC a pacientů s benigní hyperplazií prostaty bylo zjištěno, že vysoká exprese PSA v CTC nesouvisí s vysokou expresí PSA v séru. Zdá se, že cirkulující nádorové buňky by mohly být vhodným biomarkerem pro sledování průběhu onemocnění a ke sledování účinnosti podané terapie a mohly by tedy pomoci k individualizaci léčebného postupu u pacientů s CRPC.

*Tento projekt byl podpořen Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví České republiky IGA MZ NT 12205-5 a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy GA UK 539512.*

## 20| Metodické aspekty analýzy extracelulárních mikroRNA v moči pro účely diagnostiky urologických nádorů

Hana Mlčochová<sup>1,2</sup>, Renata Héžová<sup>1,2</sup>,  
Barbora Peltanová<sup>2</sup>, Jan Doležel<sup>3</sup>,  
Alexandr Poprach, Radek Lakomý,  
Ondřej Slabý<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CEITEC MU, Masarykova Univerzita, Brno

<sup>2</sup>Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

<sup>3</sup>Masarykův onkologický ústav, Oddělení urologické onkologie, Brno

Nádory močového měchýře, ledvin a prostaty jako nejvýznamnější urologické malignity představují v ČR přibližně 13 % nově diagnostikovaných zhoubných nádorů a podílejí se z 3 % na celkové populační úmrtnosti. Zatímco v případě karcinomu prostaty je k dispozici účinný sérový biomarker PSA (s limitovanou specifičností), u renálního či uroteliálního karcinomu žádný podobný biomarker není dostupný. Cystoskopie s cytologií moči, vylučovací urografie a ultrasonografie jsou v současné době nejpoužívanějšími metodami pro diagnostiku a monitorování těchto onemocnění. Jedná se o metody diskomfortní, časově a finančně náročné a v případě cystoskopie invazivní. Neustále jsou proto hledány nové neinvazivní diagnostické postupy, které by ty stávající nahradily, a to především za účelem sledování a časného zachytu relapsu těchto onemocnění. V současnosti je velmi moderním přístupem při studiu a klasifikaci solidních nádorů na molekulární úrovni analýza mikroRNA (miRNA). MiRNA jsou krátké nekódující RNA schopné posttranskripčně regulovat expresi více než poloviny genů v lidském genomu, včetně významných onkogenů či nádorových supresorů. Změny expresních profilů miRNA v nádorové tkáni, stejně jako v tělních tekutinách, jsou dnes intenzivně studovány u celé řady nádorových onemocnění včetně urologických nádorů. V posledních třech letech bylo publikováno několik prací zabývajících se možným využitím miRNA v moči pro účely diagnostiky urologických nádorů. MiRNA nacházející se v moči jsou především extracelulárního charakteru, vykazují vysokou míru stability a jsou snadno dostupné. Před použitím močových miRNA jako nové třídy biomarkerů pro onkologickou diagnostiku je ovšem nutné vyřešit celou řadu metodických aspektů jejich analýzy. Výtěžky RNA z moči jsou velice nízké a její čistota není dle konvenčních kritérií dostatečná. Tato kritéria jsou ovšem v současné době přehodnocována, a to nejen pro RNA

izolovanou z moči, ale také z krevního séra či plazmy. Je potřeba pracovat s první ranní močí? Jakou variabilitu zanáší do analýzy jednotlivé fáze zpracování vzorku od preanalytické fáze až po qRT-PCR? Hlavním cílem naší práce je analyzovat vybrané miRNA (miR-125b, miR-21) v supernatantu moči metodou kvantitativní Real-Time PCR na souboru zdravých kontrol a nastavit základní parametry analýzy, stanovit vhodnou endogenní kontrolu a ověřit stabilitu miRNA. Následně bude optimalizovaná metoda detekce miRNA v moči aplikována ve studiích zaměřených na identifikaci diagnostických biomarkerů u renálního a uroteliálního karcinomu. Výsledky pilotní studie budou součástí našeho sdělení. Předpokládáme, že miRNA nacházející se v moči mají potenciál sloužit jako nová třída neinvazivních diagnostických biomarkerů. Práce byla podpořena grantem IGA MZČR NT13547-4/2012 a Institucionálními zdroji pro Podporu výzkumných organizací poskytnutou Ministerstvem zdravotnictví České republiky v roce 2012.

## 21| Změny teploty tání DNA pro studium kovalentních interakcí DNA s cisplatinou

Lukáš Nejdřl<sup>1</sup>, Jiří Sochor<sup>1,2</sup>,  
Kristýna Šmerková<sup>1</sup>, Renata Kenšová<sup>1</sup>,  
Tomáš Eckschlager<sup>3</sup>, Marie Stiborová<sup>4</sup>,  
Vojtěch Adam<sup>1,2</sup>, René Kizek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut, VUT, Brno

<sup>3</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie, II. LF UK, Praha

<sup>4</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, UK Praha

Strukturní změny DNA hrají velmi významnou roli v procesu replikace a translace. Cisplatinou je jedním z nejběžnějších cytostatik využívaných při chemoterapii nádorových onemocnění (1). Úspěšnost léčby platinovými komplexy je dána schopností vázat se koordinační vazbou k báze DNA za vzniku různých typů kovalentních vazeb (2). Vstup cisplatinu do buňky je umožněn zejména pasivní difúzí, ale z části může být přenesena také aktivním transportem pomocí různých typů transportních systémů (Ctr1 kontrolující homeostázu mědi) (3).

Práce byla zaměřena na sledování kovalentních vazeb cisplatinu na DNA. Cílem bylo určit, jakým způsobem je vlivem různých koncentrací cisplatinu ovlivněna teplota tání DNA (bod Tm). Ke studiu byl využit PCR produkt o délce

498 bp (A = 22,09 %, T = 31,12 %, G = 21,69 %, C = 25,10 %) a cisplatinou o koncentracích 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400 a 500  $\mu$ M. Komplexy byly připraveny smícháním cisplatinu (99,9 %, Sigma-Aldrich) s DNA při teplotě 25 °C a purifikovány membránovou dialýzou (Amicon Ultra – 0,5 ml 3K) při teplotě 20 °C. Interakce DNA s cisplatinou byly pozorovány spektrofotometricky, elektroforeticky a elektrochemicky. Elektrochemicky bylo potvrzeno, že se zvyšující se aplikovanou dávkou (5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, a 500  $\mu$ M) cisplatinu se zvyšovalo navázané množství cisplatinu na DNA (0,1; 0,4; 1,5; 2,6; 3; 4; 13; 26; 40; 56 a 61 ng Pt/ $\mu$ g DNA). Bylo prokázáno, že cisplatinou významným způsobem snižuje teplotu tání při denaturaci DNA. Průměrná teplota tání fragmentu DNA byla stanovena na  $T_m = 75 \pm 3,5$  °C. Po aplikaci cisplatinu teplota tání DNA klesala v průměru o 4,5 °C. Nejnižší teploty tání ( $T_m = 35 \pm 1,75$  °C) bylo dosaženo po přidání 500  $\mu$ M cisplatinu (interkalováno bylo 61 ng Pt/ $\mu$ g DNA).

*Tato práce byla podpořena granty CYTORES GAČR P301/10/0356 a NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068.*

1. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005; 4(4): 307–320.

2. Chang CL, et al. Thermal stability of DNA with interstrand crosslinks. *Biopolymers*, 2012; 97(10): 807–817.

3. Mitchell C, et al. Low-dose BBR3610 toxicity in colon cancer cells is p53-independent and enhanced by inhibition of epidermal growth factor receptor (ERBB1)-Phosphatidylinositol 3 kinase signaling. *Molecular Pharmacology*, 2007; 72(3): 704–714.

## 22| Analýza účinku metotrexátu na buněčné linie ze solidních nádorů dětského věku

Gabriela Pavlasová<sup>1</sup>, Jakub Neradil<sup>1,3</sup>,  
Renata Veselská<sup>1,2</sup>, Karel Zitterbart<sup>2</sup>,  
Kateřina Pilátová<sup>3</sup>, Dalibor Valík<sup>3</sup>,  
Jaroslav Štěrba<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav experimentální biologie PřF MU Brno

<sup>2</sup>Klinika dětské onkologie FNB a LF MU Brno

<sup>3</sup>Masarykův onkologický ústav Brno

Solidní nádory tvoří asi 30 % všech nádorových onemocnění u dětí. Mezi nejčastější typy patří tumory mozku (meduloblastom, astrocytomy aj.), neuroblastom, rabdomyosarkom, Wilmsův tumor a osteosarkom. Součástí léčebných protokolů těchto onemocnění je téměř vždy chemoterapie, která zvyšuje šanci na dlouhodobé přežívání pacientů. U meduloblastomu a osteosarkomu bývá používán vysokodávkový metotrexát (HD-MTX). Hlavním limitujícím faktorem je však jeho toxicita. Proto se onkologickým

pacientům podává také antidotum leukovarin (LV).

Cílem této studie je analyzovat vliv MTX na buněčné linie vybraných typů solidních nádorů dětského věku (meduloblastom a osteosarkom). Snahou je popsat cytostatické, resp. cytotoxické působení MTX na obě linie, detekovat změny v jejich buněčném cyklu a zjistit rozdíly mezi působením HD-MTX a nízkodávkového MTX (LD-MTX) v přítomnosti různých koncentrací LV.

Pilotní experimenty byly prováděny na sbírkových buněčných liniích Daoy (meduloblastom) a Saos-2 (osteosarkom). MTX byl použit v rozmezí koncentrací, které se vyskytují v plazmě dětských onkologických pacientů léčených MTX (0,1 až 40  $\mu\text{M}$ ). Změny v proliferaci buněk byly zjišťovány MTT testem a změny v buněčném cyklu průtokovou cytometrií.

Bylo zjištěno, že MTX působí výrazně cytotoxicky na obě buněčné linie, přičemž nebyl zjištěn rozdíl v účinnosti 1–40  $\mu\text{M}$  MTX. Proliferace po 6 dnech působení 1–40  $\mu\text{M}$  MTX byla u linie Daoy snížena průměrně o 85 % a u linie Saos-2 o 70 % oproti kontrole. Hodnota LC50 MTX činí u linie Daoy 0,27  $\mu\text{M}$  a u linie Saos-2 0,23  $\mu\text{M}$ . Z hlediska analýzy buněčného cyklu docházelo k jeho zastavení u obou linií již 3. den po ovlivnění MTX. Stejně tak byl pozorován nárůst frakce apoptotických buněk u linie Daoy již 3. den kultivace s koncentrací MTX 1–40  $\mu\text{M}$ . U linie Saos-2 byl tento nárůst pozorován až 6. den. Apoptóza byla detekována také pomocí protilátky proti aktivované kaspáze-3. Dále byl zkoumán vliv LV na působení MTX. Bylo zjištěno, že LV ovlivňuje pouze účinek 0,1  $\mu\text{M}$  MTX, u něhož byla po aplikaci LV zaznamenána menší cytotoxicita, než u varianty bez LV.

Ze získaných dat vyplývá, že MTX působí cytotoxicky na oba typy linií, přičemž srovnatelný antiproliferativní efekt vykazuje 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  i 40  $\mu\text{M}$  MTX. Dále bylo zjištěno, že LV v terapeutických koncentracích neovlivňuje účinnost MTX v rozsahu 1–40  $\mu\text{M}$ . Dosažené výsledky ukazují, že LD-MTX (1  $\mu\text{M}$ ) má stejné účinky in vitro jako HD-MTX (40  $\mu\text{M}$ ) a může mít terapeutický potenciál v léčbě nádorových onemocnění.

Podpořeno: MUNI/C/0803/2011 a RECAMO; CZ 1.05/2.1.00/03.0101.

### 23| Analysis of selected micro RNAs in prostate cancer cell lines

Martina Raudenská<sup>1,2</sup>, Kristýna Hudcová<sup>1</sup>, Jaromír Gumulec<sup>1,3</sup>, Markéta Sztalmachová<sup>1,2</sup>, Veronika Tanhäuserová<sup>1</sup>, Michaela Fojtů<sup>1</sup>, Petr Babula<sup>4</sup>, Vojtěch Adam<sup>2,3</sup>,

Tomáš Eckschlager<sup>5</sup>, René Kizek<sup>2,3</sup>, Michal Masařík<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno

<sup>2</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno

<sup>3</sup>Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Brno

<sup>4</sup>Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

<sup>5</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine Charles University, Prague

Micro RNAs (miRNAs) are a large class of single-stranded RNA molecules involved in post-transcriptional gene silencing. MiRNAs not only regulate various developmental and physiologic processes but also are involved in cancer development. They can be also considered as biomarkers of some pathological processes. The aim of this study was to determinate the expression levels of selected miRNA and zinc (II)-related genes (*ZIP-1*, *BAX*, *MT2A*, and *MT1A*) in the non-tumor PNT1A prostate cell line in comparison with cancer cell lines 22Rv1, PC-3, and LNCaP after zinc (II) treatment. Using bioinformatic approaches we selected miRNAs with putative binding sites in 3'UTR regions in Metallothionein 1A and 2A as miRNA 23a, 141, 224, 296–3p, 320, 375 and 376. We observed significantly higher expression of miRNA 23a in all tumor lines compared to non-tumor PNT1A (13.6-fold in 22Rv1, 7.3-fold in PC-3, 8.3-fold in LNCaP,  $p < 0.01$ ). We also observed that 22Rv1 cell line has significantly higher expression miRNA 224 in comparison to other cell lines. In addition, all tumor cell lines expressed significantly higher levels of miRNA 375 in comparison to non-tumor PNT1A (87.1-fold in 22Rv1, nearly 2000-fold in PC-3, 56.3 fold in LNCaP,  $p < 0.01$ ). Nevertheless, miRNA 375 and 23a expression levels strongly suggest their potential to contribute to the diagnosis of prostate cancer and miRNA 224 eventually might be suitable for classification of primary tumors. The expression of miRNA 224 in 22Rv1 cell line was in negative correlation with increasing zinc (II) concentration only. Our experiments revealed significant negative correlation of miRNA 376 and *MT2A* in 22Rv1 and a negative correlation between miRNA 224 and *MT1A* in PC-3 which may denote possible direct regulation of *MT* genes with specific miRNA in prostate cancer.

This work was supported by grant CYTORES GAČR P301/10/0356 and NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068.

1. Masarik M. et al: Monitoring of the prostate tumour cells redox state and real-time proliferation by novel biophysical techniques and fluorescent staining. *Integrative Biology* 2012; 4: 672–684.

2. Porkka KP, et al. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Research* 2007; 67: 6130–6135.

3. Gumulec J. et al: Insight to Physiology and Pathology of Zinc (II) Ions and Their Actions in Breast and Prostate Carcinoma. *Current Medicinal Chemistry* 2011; 18: 5041–5051.

### 24| Využití nanočástic stříbra k eliminaci bakteriální infekce *Staphylococcus aureus*

Matěj Sklenář<sup>1</sup>, Andrea Bezděková<sup>1</sup>, Dagmar Chudobová<sup>1</sup>, Jiří Sochor<sup>1,2</sup>, Karel Bastl<sup>3</sup>, Vojtěch Adam<sup>1,2</sup>, René Kizek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut, VUT, Brno

<sup>3</sup>Výzkumný ústav pletařský a.s., Brno

Chirurgické zákroky jsou jednou z hlavních léčebných strategií onkologických onemocnění, avšak často mohou být komplikovány v podobě závažných bakteriálních infekcí (1). Jednou z nejvýznamnějších nemocničních bakterií je *Staphylococcus aureus* (2). Tato grampozitivní bakterie způsobuje infekce v rozsahu od mírných zánětů kůže a měkkých tkání, až po život ohrožující sepse, syndrom toxického šoku a nekrotizující pneumonie (3). Do popředí zájmu se stále více dostává problém rezistence těchto mikroorganismů vůči antibiotikům (4).

V naší práci jsme se zaměřili na stanovení antimikrobiálního efektu iontů dusičnanu stříbrného a stříbrných nanočástic s chitosanem, kolagenem a kyselinou hyaluronovou. Komplexy těchto látek byly spektrofotricky a elektrochemicky charakterizovány. Na bakteriální kulturu na Petriho misce byly umístěny vzorky textilie (1 x 1 cm), která byla napuštěna roztokem nanostříbra nebo dusičnanem stříbrným o koncentraci 1; 5; 10; 25; 50; 100; 250 a 500  $\mu\text{M}$  s 1% vodným roztokem chitosanu, kolagenu nebo kyseliny hyaluronové. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Inhibiční efekt (inhibiční zóna 1 mm) komplexu stříbrných nanočástic s chitosanem byl patrný od koncentrace 5  $\mu\text{M}$ , s kolagenem od 25  $\mu\text{M}$  a s kyselinou hyaluronovou od 50  $\mu\text{M}$ . U nejvyšší sledované koncentrace (500  $\mu\text{M}$ ) byla velikost inhibiční zóny u nanočástic stříbra s chitosanem 2,5 mm, s kolagenem 1,8 mm a s kyselinou hyaluronovou 1,5 mm. U variant s dusičnanem stříbrným dosahovala velikost inhibiční zóny u koncentrací 500  $\mu\text{M}$  s chitosanem 2 mm, s kolagenem 1,5 mm a s kyselinou hyaluronovou 1,3 mm.



Minimální inhibiční koncentrace (MIC) se u komplexu nanostříbra s chitosanem projevila od koncentrace 10  $\mu\text{M}$  a zcela byla inhibována od 100  $\mu\text{M}$ . U variant nanostříbra s kolagenem a kyselinou hyaluronovou byla MIC 25  $\mu\text{M}$ , tyto varianty byly zcela inhibovány od 250  $\mu\text{M}$ . U komplexu dusičnanu stříbrného s chitosanem byla MIC u varianty s přidavkem 25  $\mu\text{M}$ , zcela inhibována byla tato varinata od koncentrace 500  $\mu\text{M}$  stříbrných iontů. U komplexů s kolagenem a kyselinou hyaluronovou byla MIC 50  $\mu\text{M}$ , tyto varianty byly zcela inhibovány od 500  $\mu\text{M}$ . Nejlepších antimikrobiálních vlastností dosahoval komplex stříbrných nanočástic a chitosanu.

*Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem NanoCeva TA ČR TA01010088.*

1. Kang CI, et al. Clinical features and outcomes of Staphylococcus aureus infections in non-neutropenic cancer patients. *Supportive Care in Cancer*, 2012; 20(3): 483–488.
2. Sochor J, et al. Bio-Sensing of Cadmium (II) Ions Using Staphylococcus aureus. *Sensors*, 2011; 11(11): 10638–10663.
3. Garcia-Garcera M, et al. Staphylococcus prevails in the skin microbiota of long-term immunodeficient mice. *Environmental Microbiology*, 2012; 14(8): 2087–2098.
4. Garcia-Vazquez E, et al. A comparative study of patients with methicillin susceptible versus methicillin resistant Staphylococcus aureus bacteremia: epidemiology and prognostic factors. *Medicina Clinica*, 2007; 128(18): 681–686.

## 25| Výživa versus zhubný novotvar

Ladislav Slováček

Klinika onkologie a radioterapie FN a LF UK Hradec Králové

Je známo, že až 80 % nemocných s pokročilým či metastazujícím nádorovým onemocněním trpí nádorovou anorexií s projevy nádorové kachexie, které zhoršují celkovou prognózu přežití pacienta. Nádorovou kachexii způsobují faktory, které jsou uvolňovány samotnými nádory a zánětlivou reakcí hostitele na přítomnost nádoru. Tyto faktory snižují chuť k jídlu, narušují metabolismus tuků, bílkovin a sacharidů. Jednotlivá stadia kachexie zahrnují: prekachexii, syndrom kachexie a pokročilou kachexii. Poruchy výživy u pacienta s nádorovým onemocněním lze rozdělit do dvou skupin, primární a sekundární. Mezi primární příčiny řadíme vlastní nádorový proces a chronické obtíže či komplikace vznikající v důsledku progresu nádoru. Mezi sekundární příčiny řadíme důsledky předchozí protinádorové terapie a druhotné projevy nádoru (nevolnost a zvracení, nechutenství, váhový úbytek, xerostomie, insuficetní či karézní chrup, polykací obtíže, problémy s defekací ve smyslu zácpy či průjmu, snížená obranyschopnost organismu s rizikem rozvoje infekční komplikace). Léčebné možnosti nádorové anorexie a kache-

xie z onkologického hlediska zahrnují 2 základní intervence, nutriční a farmakologickou. Nutriční intervence zahrnuje: dietní poradenství, orální nutriční přípravky (sipping), umělá klinická výživa (enterální, parenterální). Farmakologická intervence zahrnuje aplikaci stimulátorů chuti: hormonální preparáty, kortikosteroidy, psychofarmaka (antidepresiva, atypická neuroleptika, benzodiazepiny krátkodobě působící). Je známo, že jakákoliv léčebná intervence respektive její efekt musí být vyhodnocen či průběžně hodnocen. V případě nutriční intervence u onkologických nemocných je nutné provádět pravidelné kontroly nutričního stavu pacienta, které zahrnují: nutriční anamnézu týkající se možností či limitací v perorálním příjmu stravy a tekutin, váhový úbytek, hodnocení Karnofského výkonnostního stavu, základní antropometrická měření (váha, výška, body mass index) a zhodnocení celkové kvality života pacienta.

*Podpořeno Výzkumným projektem MZdr. ČR No. 00179906, Specifickým vysokoškolským výzkumem UK Praha č. 53251 a projektem PRVOUK P37/06.*

## 26| Genetický polymorfismus mismatch reparačního genu hMLH1 vo vztahu ku karcinómu plic

Petra Slováková, Lucia Letková, Erika Halašová, Tatiana Matáková

Ústav lékařské biologie, Jesseniova lékařská fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Rakovina plic patří mezi nejzávažnější onemocnění současnosti. Na Slovensku v roce 2010 zapříčinila 2113 úmrtí, což představuje takmer jednu šestinu všech úmrtí na nádorové onemocnění. K vysoké mortalitě rakoviny plic přispívá zejména neskoré diagnostikování, komplikované absencí varovných příznaků v ranných stádiích onemocnění.

Jednou z možností, která by mohla přispět k včasné identifikaci rizikových jedinců a zvýšit tak pravděpodobnost vyléčení, je výskum v oblasti genetických polymorfismů. V současnosti se výskum genetických polymorfismů zaměřuje zejména na geny súvisiace s metabolismem xenobiotik, protoonkogény, tumor-supresorové geny a na geny kódující enzymy reparační poškozené DNA. Jedným z genů, ktorého produkt je súčasťou mismatch reparačnej dráhy podieľajúcej sa na odstránení širokého spektra spontánnych aj indukovaných poškodení je hMLH1. Gén hMLH1 je lokalizovaný v oblasti 3p2.22 a kóduje proteín MLH1, ktorý samostatne nevykazuje žiadnu známu enzymovú

aktivitu, ale formuje niekoľko typov enzymových dimérov, vykazujúcich endonukleázovú aktivitu, zodpovedných za nábor proteínov potrebných pre excíziu poškodenia a následné dosyntetizovanie vyštípeného úseku DNA. V súvislosti s nádorovými ochoreniami je u genu hMLH1 často sledovaný polymorfizmus -93G>A.

Meta-analýza 33 relevantných štúdií poukázala na zvýšené riziko vzniku rakoviny u nositeľov variantnej alely A vo všetkých genetických modeloch, najmä medzi neaziatmi. V našej štúdií sa snažíme objasniť, či sledovaný polymorfizmus -93G>A genu hMLH1 má vplyv na zvýšené riziko vzniku rakoviny plic v slovenskej populácii.

*Grantová podpora: Projekt je podporený ministerstvom školstva SR: APVV-0412-11 a ministerstvom zdravotníctva SR: MZ 2007/48-UK-13.*

## 27| Hodnocení perifokálního edému u kazuistik glioblastomů grade IV s imunofenotypem VEGF (+), NNOS (+) a hodnocení amplifikace TP53 A HER2/C-NEU

Libor Staněk<sup>1</sup>, David Vajtr<sup>2</sup>, Pavel Dunder<sup>1</sup>, Filip Šámal<sup>3</sup>, Magdaléna Fořtová<sup>4</sup>, Martin Filip<sup>3</sup>, Richard Průša<sup>4</sup>, Tomáš Zima<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

<sup>2</sup>Ústav soudního lékařství a toxikologie

1. LF UK a VFN, Praha

<sup>3</sup>Oddělení Neurochirurgie KNTB, Zlín

<sup>4</sup>Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN, Praha

<sup>5</sup>Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha

VEGF je hlavním angiogenním faktorem a faktorem cévní permeability u glioblastoma multiforme (GBM) zodpovědným za tvorbu vazogenního mozkového edému podílejícího se na morbiditě a mortalitě pacientů. Schoenegger et al. (European Journal of Neurology 2009) prezentovali výsledky předoperačního vyšetření peritumorálního edému pacientů s glioblastoma multiforme (GBM) jako další nezávislý prognostický faktor spolu s věkem a typem nádoru (primární vysoce buněčný GBM, s nediferencovanými pleomorfními elementy, ložisky nekrózy, glomeruloidní vaskulární hyperplazie, s expresí proliferativního markeru Ki-67 v 15 až 20 % s delší dobou přežití ve srovnání se sekundárními GBM). Pacienti s větším edémem měli kratší interval přežití. Perifokální edém komplikuje neurochirurgickou resekci nádoru, často působí nitrolební hypertenzi u recidivy nádoru.

Do studie byla použita fixovaná tkáň zalitá do parafinových bločků. Imunohistochemie byla provedena pomocí primárních protilátek



(Chemikon, Lifespan Biosciences a Abcam), barevná reakce provedena sekundární protilátkou s použitím chromogenního substrátu di-amino-benzidinu (DAB). Pro FISH, byly použity sondy Vysis LSI HER-2/neu/CEP 17 Probe (Abbot Molecular); Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen Probe (Abbot Molecular).

Srovnáváme kazuistiky pacientů s primárním a sekundárním GBM. U primárních GBM byla prokázána overexprese p53, nízká exprese VEGF (<5 %) a vysoká exprese neuronální NOS (80 %) (imunohistochemicky). U sekundárních GBM byla prokázána nízká exprese p53 (<10 %), srovnatelná exprese neuronální NOS (70 %) a zvýšená exprese VEGF (20 %) (imunohistochemicky). Genetické vyšetření prokázalo u primárních GBM slabou amplifikaci genu TP53, ojedinělou amplifikaci genu HER-2/neu a neprokázala polyzomii CEP 17. U sekundárního glioblastomu genová analýza prokázala polyzomii CEP17, nebyla pozorovaná exprese genu TP53 ani genu HER-2/neu. U pacienta se sekundárním GBM byla také imunohistochemicky detekovaná exprese nestinu (prokazující progenitorové oligodendrogliomové buňky). Doba přežití pacientů s primárním GBM byla delší (21 M a 24 M) ve srovnání s pacienty se sekundárním GBM (přežití 11 M). Předoperační CT vyšetření prokázalo menší perifokální edém u kazuistik primárního GBM a větší kolaterální edém sekundárního GBM.

Větší imunohistochemická exprese VEGF je spojena s rozvojem perifokálního edému. U primárních glioblastomů byla prokázána amplifikace genu TP53 a minoritní nález amplifikovaného genu podrodiny EGFR receptorů HER2/c-neu (ErbB-2). Tyto doložené nálezy mohou mít prognostický význam.

## 28| Využití molekulárních metod v bioptické diagnostice maligního melanomu

Libor Staněk<sup>1</sup>, Pavel Dundr<sup>1</sup>, Soňa

Lisová<sup>1</sup>, Tatjana Maňáková<sup>1</sup>, David Vajtr<sup>2</sup>,

Radek Jakša<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologie, 1. LF UK a VFN, Praha

<sup>2</sup>Ústav soudního lékařství a toxikologie, 1. LF UK a VFN, Praha

Výskyt maligního melanomu kůže (CMM) má nejrychleji vzrůstající incidenci v populaci na světě. Rozdíl mezi benigní a maligní melanocytárních lézí představuje velkou výzvu pro patologa a jedná se o velice obtížnou diagnostiku. Zde se jeví jako užitečná pomocná metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Díky této metodě můžeme sledovat zmnožení nebo ztrátu specifických chromozomálních oblastí.

Cílem studie je pomocí fluorescenčně značených sond kombinované sondy Vysis LSI RREB1/LSI Myb/LSI CCND1/CEP6 (Abbot Molecular, USA), detekce numerických změn vyskytujících se u maligních melanomů.

Do studie bylo retrospektivně zařazeno 14 vzorků tkání se stanovenou bioptickou diagnózou (6x maligní melanom, 8x benigní melanocytární léze). K detekci byla použita sonda Vysis LSI RREB1/LSI Myb/LSI CCND1/CEP6 (Abbot Molecular, USA), fluorescenční mikroskop Olympus AX70 (imerzní objektiv 1000x). V oblasti nádoru byly spočítány signály jednotlivých sond a vyhodnoceny dle pokynů výrobce.

Hodnotitelné výsledky byly získány v 10/14 případech (71 %), z toho byly 4 melanomy a 6 benigních melanocytárních lézí. U všech 4 případů maligního melanomu byly zastíženy genetické změny, převážně amplifikace v genu CCND1 (75 %) a PREB1 (50 %). V 10 % byla detekována vzácná monozomie genu MYB. Oproti tomu u všech 6 benigních melanocytárních lézí byl prokázán normální nález.

DNA abnormality detekovány pomocí FISH jsou v drtivé většině u maligních melanomů, ale nejsou detekovány u benigních névů. FISH testování se jeví jako důležitý krok v diferenciální diagnostice melanocytárních lézí s nejasným nebo hraničním histologickým nálezem.

## 29| Studium interakce rostlinných steroidů s receptory pro steroidní hormony u nádorů prsu a prostaty

Jana Steigerová<sup>1,2</sup>, Lucie Rárová<sup>3</sup>,

Jana Oklešťková<sup>4</sup>, Kateřina Křížová<sup>1,2</sup>,

Michaela Šváchová<sup>5</sup>, Zdeněk Kolář<sup>1,2</sup>,

Miroslav Strnad<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř molekulární patologie, Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP Olomouc

<sup>2</sup>Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc

<sup>3</sup>Laboratoř růstových regulátorů, PíF UP Olomouc a Ústav experimentální botaniky AV ČR

<sup>4</sup>Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Ústav růstových regulátorů, PíF UP Olomouc

<sup>5</sup>Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc

Jaderné receptory steroidních hormonů se podílejí na regulaci homeostázy, reprodukce, metabolismu a ontogenetického vývoje. Představují ligandy indukované transkripční faktory umožňující přímé propojení signálních molekul kontrolujících důležité buněčné procesy s transkripční odpovědí. Po navázání aktivační molekuly mění svou

konformaci a jsou schopny po vstupu do jádra regulovat transkripci DNA. Skupinu příbuzných ligandů představují steroidy, hormony štítné žlázy, retinoidy a „seco-steroidy“ (metabolity a isoformy vitamínu D). Do rodiny jaderných receptorů patří rovněž řada v nedávné době objevených proteinů, jejichž aminokyselinová sekvence jeví různý stupeň příbuznosti, a u kterých v současné době není znám nebo donedávna nebyl známý odpovídající ligand. Byly identifikovány některé přirozené a syntetické ligandy, které umožnily objasnit biologickou úlohu některých z těchto receptorových molekul a umožnily tak objevit nové regulační dráhy zprostředkované retinoidy, mastnými kyselinami, eikosanoidy a steroidy, které se ukázaly být významné pro fyziologické procesy a potenciální farmakologické využití.

Cholestanové deriváty jsou novou skupinou látek, jejichž mechanismus působení není kompletně prozkoumán na molekulární úrovni. Jedná se o analoga polyhydroxylových derivátů sterolu představující jeden z typů regulátorů růstu rostlin. Některé syntetizované deriváty cholestanu testované *in vitro* vynikaly výraznou cytotoxickou aktivitou na savčí buňky. Na základě strukturálních motivů těchto látek se předpokládá, že by mohly zahrnovat interakce s receptory pro steroidní hormony.

Tato práce je zaměřená na studium účinku přírodních typů brassinosteroidů a vybraných steroidních derivátů na lokalizaci a expresi androgenového receptoru (AR), estrogenových receptorů (ER- $\alpha$  a ER- $\beta$ ) a progesteronového receptoru (PR) u buněčných linií odvozených od karcinomu prsu (MCF-7, MDA-MB-468) a prostaty (LNCaP, DU-145) a na objasnění případných rozdílů mezi jejich expresí u hormonálně citlivých a hormonálně necitlivých buněk, které by napomohly lépe pochopit mechanismy nádorové progresy a perspektivně vést k vývoji účinnější terapie. Výsledky by mohly přispět k bližší specifikaci účinku studovaných látek na hormonálně citlivé a necitlivé lidské nádorové linie a případně přinést vysvětlení odlišné terapeutické odpovědi nádorů s rozdílnou histogenezí a hormonální rezpozibilitou.

*Tato práce je financována za příspěví grantů IGA MZ ČR NT11060; ED0007/01/01 Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum; granty IAA400550801 a 1M06030; Biomedicína pro regionální rozvoj a lidské zdroje C.1.05/2.1.00/01.0030.*

## 30| Analysis of pro- and antiapoptotic genes in prostate cancer

Markéta Sztalmachová<sup>1,2</sup>,

Monika Holubová<sup>1</sup>, Jan Balvan<sup>1</sup>,

Martina Raudenská<sup>1,2</sup>, Jaromír Gumulec<sup>1,3</sup>,  
Veronika Tanhäuserová<sup>1</sup>, Hana Polanská<sup>1,2</sup>,  
Petr Babula<sup>4</sup>, Vojtěch Adam<sup>2,3</sup>,  
Tomáš Eckschlager<sup>5</sup>, René Kizek<sup>2,3</sup>,  
Michal Masářík<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathological Physiology,  
Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno

<sup>2</sup>Department of Chemistry and Biochemistry,  
Mendel University in Brno

<sup>3</sup>Central European Institute of Technology,  
Brno University of Technology, Brno

<sup>4</sup>Department of Natural Drugs, Faculty of  
Pharmacy, University of Veterinary and  
Pharmaceutical Sciences, Brno

<sup>5</sup>Department of Paediatric Haematology and  
Oncology, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine Charles  
University, Prague

There have been found several typical characteristics of prostate tissue including the ability to accumulate zinc (II). However, this feature of prostate cells is lost during carcinogenesis and, thus, prostate cells are unable to accumulate zinc (II) ions in such higher levels. Therefore, we can expect that zinc (II) ions can significantly contribute to the progression of tumour disease and to the ability of prostate cell lines to metastasize. In this study, we aimed our attention on determining of expression of Bcl-2, c-Fos, c-Jun, Ki-67, NF-κB and p53 genes in two prostate cell lines as 22Rv1 cell line, a model of aggressive partially androgen-sensitive prostate cancer and as PNT1A cell line, a model of healthy cell line. Moreover, we were interested in the issue how exposure of these cell lines to zinc (II) ions could influence expression of the above mentioned genes. We found that zinc (II) ions caused elevated expression of Ki-67, a marker of proliferation, extremely low expression of p53, high expression of Bcl-2 and also no changes in expression of p53. Our experimental data show different effect of zinc (II) ions on expression of above-mentioned regulatory genes, which may give us more information about their impact on cancer development, progression and possible aims in cancer therapy.

*This work was supported by grant CYTORES GAČR P301/10/0356 and NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068.*

**1.** Costello LC, Franklin RB. The intermediary metabolism of the prostate: A key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology* 2000; 59: 269–282.

**2.** Masarik M, et al. Monitoring of the prostate tumour cells redox state and real-time proliferation by novel biophysical techniques and fluorescent staining. *Integrative Biology* 2012; 4: 672–684.

**3.** Gumulec J, et al. Insight to Physiology and Pathology of Zinc (II) Ions and Their Actions in Breast and Prostate Carcinoma. *Current Medicinal Chemistry* 2011; 18: 5041–5051.

### 31| Mutace v KRAS, BRAF, PIK3CA genu a jednonukleotidový polymorfismus (SNP) ve vazebném místě pro let-7 mikroRNA v 3'-UTR oblasti KRAS genu (KRAS-LCS6) u pacientů s kolorektálním karcinomem

Jarmila Šimová<sup>1,2</sup>, Barbora Kubová<sup>1</sup>,  
Magdalena Uvírová<sup>1,2</sup>, Irena Urbanovská<sup>1</sup>,  
David Konvalinka<sup>1</sup>, Iveta Žebráková<sup>1</sup>,  
Jana Žmolíková<sup>1</sup>, Sylva Pitronová<sup>1</sup>,  
Jana Dvořáčková<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CGB laboratoř a.s., Laboratoř molekulární  
genetiky a patologie, Ostrava

<sup>2</sup>Lékařská fakulta Ostravské univerzity,  
Ostrava

**Úvod:** Kolorektální karcinom (CRC) patří celosvětově k nejrozšířenějším nádorovým onemocněním. Mutační status KRAS genu slouží jako prediktivní biomarker pro cílenou biologickou léčbu pomocí monoklonálních protilátek proti EGFR. Přesto ne všichni pacienti KRAS wild-type reagují na tuto léčbu. To vede k hledání dalších nových potenciálních prediktivních markerů. Současné poznatky naznačují, že mutace v dalších genech kódujících proteiny EGFR signální dráhy (BRAF, PIK3CA), mohou vést k rezistenci na anti-EGFR terapii. Rovněž jako možné diagnostické, prognostické či prediktivní markery mohou podle nejnovějších studií sloužit i změny expresních profilů mikroRNA (miRNA), případně ovlivnění jejich funkce v důsledku výskytu SNP. Polymorfismus rs61764370 (T>G) v let-7 miRNA komplementárním místě (LCS6) oslabuje vazbu zralé let-7 k cílové KRAS mRNA.

**Cíl:** Analýza vybraných mutací v genech KRAS, BRAF, PIK3CA. Detekce SNP (rs61764370, T>G) v 3'-UTR KRAS genu, vazebném místě pro let-7 mikroRNA (KRAS-LCS6).

**Materiál a metody:** Nádorová DNA pacientů s CRC byla izolována převážně z parafinových bloků, případně z nativní nebo fixované nádorové tkáně. Analýza mutací v KRAS genu (kodon 12, 13, 61), BRAF genu (kodon 600) a PIK3CA genu (kodony 542, 545 a 1047) byla provedena pomocí metod PCR a reverzní hybridizace (KRAS StripAssay, ViennaLab), real-time PCR (cobas4800 KRAS Mutation Test, cobas 800 BRAF V600 Mutation Test, Roche), sekvenčně specifické PCR, primer extension analýzy. Analýza SNP (rs61764370, T>G) v 3'-UTR KRAS genu (KRAS-LCS6) byla provedena pomocí metody PCR+RFLP.

**Výsledky:** Retrospektivně byl na přítomnost vybraných mutací v KRAS, BRAF a PIK3CA genu analyzován soubor 419 nádorových DNA pacien-

tů s CRC. Mutace v KRAS genu byly detekovány v 38,9 % (163/419), mutace v BRAF genu v 5,5 % (23/419) a mutace v PIK3CA genu v 9,1 % (38/419). Mutace v KRAS a BRAF genu se nevyskytly současně. Současný výskyt mutací byl pozorován v KRAS a PIK3CA genu u 5,5 % (23/419). Rovněž ve dvou případech (0,5 %) byla detekována přítomnost mutace v BRAF genu současně s mutací v PIK3CA genu. SNP (rs61764370, KRAS-LCS6, T>G) byl stanoven u 164 CRC pacientů. Genotyp KRAS-LCS6 T/T byl detekován u 146 (89 %), genotyp T/G byl detekován u 18 pacientů (11 %), genotyp G/G nebyl zachycen. V případě stratifikace pacientů na KRAS/BRAF wild-type byla KRAS-LCS6 varianta (G alela) přítomna v 14,5 % (11/76) a v souboru KRAS mutant v 7,95 % (7/88).

**Závěr:** Frekvence mutací v KRAS, BRAF i PIK3CA genu koreluje s publikovanými údaji. Stejně tak koreluje koexistence PIK3CA mutací s mutacemi v KRAS nebo BRAF genu a výlučnost současného výskytu mutací KRAS a BRAF genu. Frekvence výskytu KRAS-LCS6 G alely v KRAS/BRAF wild-type souboru koreluje s daty publikovanými Páezem et al., 2010. Rozdílný závěr byl však pozorován v případě stratifikace pacientů na skupinu KRAS/BRAF wild-type a KRAS mutant, kde Graziano et al., 2010 publikoval signifikantně častější výskyt LCS6-G alely u skupiny KRAS mutant, což jsme na našem souboru nepozorovali a spíše byl pozorován opačný trend.

S objevem řady potenciálně účinných inhibitorů proteinů signální dráhy EGFR receptoru, ale i nových možných terapeutických cílů (miRNA), nabývá na významu nejen stanovení mutačního statutu KRAS genu, ale i genetické profilování nádoru o další potenciální markery umožňující selekci pacientů, kteří by mohli profitovat z cílené biologické léčby.

### 32| The role of nuclear receptors in prostate and colon cancer after exposure to fatty acids and PPAR ligands

Ondřej Zapletal<sup>1,2</sup>, Nicol Straková<sup>1,3</sup>,  
Zuzana Tylichová<sup>1,2</sup>, Radek Fedr<sup>1</sup>,  
Karel Souček<sup>1</sup>, Jiřina Hofmanová<sup>1,2</sup>,  
Alois Kozubík<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cytokinetics, Institute of  
Biophysics, Acad. Sci. Czech Rep., v.v.i., Brno

<sup>2</sup>Institute of Experimental Biology, Faculty of  
Science, MU Brno

<sup>3</sup>Laboratory of Molecular Pathology,  
Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky  
University, Olomouc

Nuclear receptors comprise a large group of transcription factors involved in the regulati-

on of proliferation, differentiation, cell death and homeostasis. Thus, their participation in tumor development is supposed. The best described nuclear receptor is the androgen receptor (AR). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are another class of nuclear receptors, which can regulate metabolic processes, inflammation, proliferation and differentiation of various cell types. There are three isoforms, PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ . PPAR $\gamma$  tilts the balance from storage to energy expenditure and promotes insulin sensitivity. It forms heterodimer complex with retinoid receptor RXR $\alpha$ . PPAR $\gamma$  natural ligands are polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as n-3 docosahexaenoic acid (DHA). Rosiglitazone (RGZ) belongs to thiazolidinediones (TZD) and represents the strict synthetic ligand of PPAR $\gamma$ . It is known that DHA regulates expression of genes involved in lipid metabolism but also in proliferation and death of the colon and prostate cancer cells. In addition, TZD can suppress growth of these cells by PPAR $\gamma$ -dependent or independent way. Association of RGZ and DHA effects with expression and activity of PPAR $\gamma$  needs further investigation.

The aim of our study was to compare the sensitivity of human cancer cell lines to DHA

and RGZ treatment with regard to their nuclear receptor expression.

We performed a detailed analysis of comparison the expression of nuclear receptors (AR, PPAR, RXR and RAR) in different human cell lines derived from colon and prostate cancer. AR expression was detected only in the prostate LNCaP cell line. The rest of tested prostate cells were AR negative, which is in agreement with literature. Expression of RXR $\alpha$  has not differed among cell lines. On the other hand, PPAR $\gamma$  highest expression was found in colon adenocarcinoma cell line HT-29 and prostate carcinoma cell line PC3. Immunofluorescent staining showed that PPAR $\gamma$  is localized in the nucleus only in prostate cells PC3 whereas in colon cells HT-29 cells the expression was not limited on nucleus and PPAR $\gamma$  was observed everywhere in the cells.

Moreover, we were interested in the effect of RGZ and DHA on proliferation, changes of nuclear receptor expression and cell death of PC3 and HT-29. We demonstrated that RGZ and DHA reduced proliferation of both colon and prostate cancer cells depending on the concentration and time of exposure and the sensitivity to RGZ corresponded with expression of PPAR $\gamma$ . In both prostate

PC3 and colon HT-29 cells RGZ reduced expression of PPAR $\gamma$ . In addition, immunofluorescent staining showed that RGZ slightly decreased expression in nucleus in PC3 cells. Interestingly, RGZ distinctly enhanced perinuclear localization of PPAR $\gamma$  protein in HT-29 cells.

Finally, our experiments were focused on combined treatment of PC3 and HT-29 cells. Importantly, combined treatment of RGZ with DHA was more effective (reduced proliferation, enhanced cell death) than treatment with individual drugs. Expression of PPAR $\gamma$  was reduced also by combination RGZ with DHA, which alone had no effect. In opposite, DHA decreased expression of fatty acid synthase (FASN), which was not changed after RGZ treatment. Higher concentration of RGZ (100 $\mu$ M) induced apoptosis (detected by PARP cleavage), which was enhanced by combination with DHA.

In conclusion, RGZ decreased proliferation of both prostate and colon cancer cell lines and reduced expression of PPAR $\gamma$ . In PC3 cells RGZ effects on cell proliferation and apoptosis was enhanced by combination with DHA.

*This work was supported by grants MUNI/C/0844/2011, NT/11201-5 and P301/11/1730.*



**Ing. Milena Španělová - SpinChem**  
**Těšínská 6, 31200 Plzeň**  
**tel., fax: +420 377 265 214**  
**info@spinchem.cz, www.spinchem.cz**

- zastoupení řady zahraničních výrobců
- nabídka sortimentu pro výzkumné i praktické využití v medicíně a přírodních vědách
- již 18 let kvalitních služeb našim zákazníkům

Adipogen AG, Switzerland

Biomol GmbH (Německo)

Covance Research Products Inc. USA

Exalpha Biologicals, Inc. MA, USA

Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. PA, USA (UK)

ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Israel

Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA

Spectrum Laboratories, Inc. USA (NL)

<http://www.adipogen.com>

<http://www.biomol.de>

<http://www.crpinc.com>

<http://www.exalpha.com>

<http://www.jacksonimmuno.com>

<http://www.prospecbio.com>

<http://www.scbt.com>

<http://eu.spectrumlabs.com>

Nabízíme služby při dovozu produktů i od jiných firm podle vašich potřeb

**[www.spinchem.cz](http://www.spinchem.cz), [info@spinchem.cz](mailto:info@spinchem.cz)**

#### POŘADATEL

- Ústav molekulární a translační medicíny  
LF UP a FN Olomouc
- Ústav klinické a molekulární patologie  
LF UP a FN Olomouc

#### Odborná garance

- Sekce diagnostické a prediktivní onkologie  
České onkologické společnosti ČLS JEP
- Komplexní onkologické centrum Olomouc
- Nadace pro výzkum rakoviny –  
Rakovina věc veřejná

**SOLEN**  
MEDICAL EDUCATION

# VIII. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie

29.– 30. listopadu 2012, Olomouc

#### HLAVNÍ PARTNER



#### PARTNEŘI

**AstraZeneca Czech Republic, s. r. o.**

**BARIA s. r. o.**

**BIOMEDICA ČS, s. r. o.**

**East Port Praha, s.r.o.**

**Eppendorf Czech & Slovakia s. r. o.**

**GeneTiCA s. r. o.**

**GLYNN BROTHERS CHEMICALS Prague, spol. s r. o.**

**IMUNOTOP CZ s. r. o.**

**Ing. Milena Španělová – SpinChem**

**IntellMed, s. r. o.**

**Olympus Czech Group, s.r.o., člen koncernu**

**Pragostem s. r. o.**

**TATAA Biocenter, s. r. o.**

**TRIGON PLUS, spol. s r. o.**

#### MEDIÁLNÍ PARTNEŘI

**SOLEN**  
MEDICAL EDUCATION

Onkologie



**GRADA**

portál

**maxdorf**

pr+ Lékaře  
www.prolekare.cz





## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE SVĚTOVÝCH ZNAČEK



### MULTIFUGE X1/X3

nová řada univerzálních centrifug  
až 4 x 750 ml, výkon do 15 200 ot.  
např. 40 x kónická zkumavka 50 ml  
unikátní systém upínání rotoru  
bez klíče Autolock®

### HERASAFE KS

kompletní řada špičkových biohazard boxů tř. II  
certifikace podle ČSN EN 12469 - ochrana obsluhy  
interní prostředí - třída čistoty ISO 4 dle EN ISO 14644-1  
dva nebo tři HEPA filtry, volitelně uhlíkové filtry



### MULTISKAN GO

UV-VIS mikrodestičkový spektrofotometr  
pro 96 a 384 jamkové mikrodestičky  
v nabídce také verze pro mikrodestičky a květy

### Sorvall LYNX

špičkové vysokorychlostní centrifugy  
maximální výkon až 100 000 x g  
široká nabídka rotorů včetně FiberLite  
Autolock® upínání rotorů



### Forma 88000

výkonné a spolehlivé  
hlubokomrazicí boxy -86°C  
kapacita 369 až 950 l  
řada bezpečnostních prvků  
stojanové i pultové provedení

### GreenLine Tecniplast

komplexní IVC technologie chovu  
laboratorních zvířat  
bariéra na úrovni klecí  
garantované prostředí i ochrana okolí  
kompletní řešení zvěřinců všech velikostí



### PXi SYNGENE

gel imaging systémy v řadě modifikací  
pro fluorescenční  
i chemiluminiscenční aplikace  
výběr chlazených kamer  
s rozlišením až 8 MPix

### CoolSafe Pro

řada lyofilizátorů pro laboratorní  
i poloprovodní účely  
kapacita od 2,5 do 40 kg/ 24 hod  
vymrazovací jednotky -55°C až -110°C



### F1- ClipTip

unikátní nová řada pipet  
západkový mechanismus  
absolutně stejné nasazení špiček  
na všech kanálech  
spolehlivá reprodukovatelnost  
dávkování

### HERAcell 150i

inkubátor s řízenou  
atmosférou CO<sub>2</sub>  
výborné kultivační prostředí  
kapacita 151 l nebo 240 l  
horkovzdušná dekontaminace ContraCon





# Tato molekula má správnou diagnózu od roku 1953

Jsme přesvědčeni že současná léčba musí odpovídat individuálním potřebám pacienta a jeho typu onemocnění. Informace v lidských genech a proteinech jsou naším manuálem, ve kterém můžeme číst pomocí systémů **cobas**<sup>®</sup> a VENTANA BENCHMARK.

Naše inovace léčby a diagnostiky pomáhají milionům lidí po celém světě zmírnit jejich potíže a zlepšit kvalitu jejich života.

Dáváme lidem naději.



*We Innovate Healthcare*