

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2017

Alexandra Dolníková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Cytogenetické zmeny u pacientov
s nemalobunkovým karcinómom pľúc**

Bakalárska práca

Alexandra Dolníková

Študijný program: Biologie

Študijný obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma štúdia: Prezenčná

Olomouc 2017

Vedúci práce: Mgr. Jana Potočková

Prehlásenie

„Čestne prehlasujem, že predloženú prácu som vypracovala samostatne, pod vedením školiteľky Mgr. Jany Potočkovej, s použitím uvedenej odbornej literatúry.“

V Olomouci dňa:

.....

Podpis

Súhrn

Integritu a riadenie biologických pochodov pre správne fungovanie ľudského organizmu zabezpečuje množstvo buniek, ktoré sa navzájom odlišujú tvarom, veľkosťou a funkciou. Bunky, ktoré sú tvarovo a funkčne podobné sa organizujú do vyšších súborov a tvoria tkanivové štruktúry. Deje a procesy, ktoré v bunkách prebiehajú bývajú striktné kontrolované regulačnými mechanizmami z jadra. V prípade narušenia genetickej regulácie sa bunky začínajú správať neadekvátne, dochádza k zvýšenej bunkovej proliferácii, rezistencii voči apoptóze (programová bunková smrť) a k vzniku masívneho tkaniva – nádoru (tumoru).

Medzi rakovinové ochorenia s vysokou frekvenciou úmrtí patrí pľúcny karcinóm. V minulosti sa rakovina pľúc týkala prevažne mužov a fajčiarov, v posledných rokoch je zaznamenávaný postupný nárast výskytu u žien a taktiež u nefajčiarov. Najpočetnejším typom rakoviny pľúc je z hľadiska mikroskopického vzhladu buniek nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC, non small cell lung cancer), ktorý predstavuje približne 75-80 % prípadov.

Na základe pribúdajúcich poznatkov sa do klinickej praxe zaviedla cielená biologická liečba namierená voči konkrétnym molekulárnym cieľom (biomarkerom) v nádorových bunkách. Podstatou biologickej liečby je zacielenie terapeutika len na nádorové bunky. Bolo identifikovaných niekoľko biomarkerov v rámci NSCLC, proti ktorým sa podarilo vyvinúť a úspešne zaviesť do praxe cielené preparáty. Rutinne vyšetrovanými sa stali mutácie v géne EGFR a génovej rodine RAS, prestavby génu ALK a ROS1. Genómové testovanie prispelo k objavu molekulárných zmien v prestavbách génu RET, amplifikácii MET a aktivačných mutácii génov BRAF a HER2, ktoré sa javia ako potenciálne biomarkery pre budúce terapie.

Cieľom tejto bakalárskej práce bola analýza molekulárných biomarkerov u pacientov s NSCLC, ktoré by prispeli k navrhnutiu efektívnej liečby. V klinickej praxi sa bežne k vyšetreniu genetických alternácií používa metóda FISH (fluorescenčná *in situ* hybridizácia), tá bola uplatnená pri vyšetrení génov EGFR, ALK a ROS1 u 40 pacientov. Prínosom práce bolo vyšetrenie potenciálnych prediktívnych biomarkerov RET a NTRK1 a posúdenie korelácie medzi zistenými mutáciami génov a klinicko-patologickými dátami pacientov.

Summary

Integrity and managing of biological processes for right functioning of human organism guard high amount of cells, which differ in form, size and function. Cells, that are formally and functionally similar, are organized into higher systems and they create tissue structures. Many processes, which conduct in cells, are strictly controlled by regulatory mechanisms from core. In case of disruption of genetic regulation cells begin to behave inadequately, what leads to higher cell proliferation, resistention against apoptosis (programmed cell death) and origin of massive tissue - tumour.

Lung carcinoma belongs to cancer diseases with high frequency of death. In the past, lung carcinoma was connected mainly with men and smokers. In recent years there has been higher cancer presence by women and non-smokers. The most numerous kind of lung carcinoma is from microscopical point of appearance of cells non small cell lung cancer, they make up approximately 75-80 % cases.

Based on the latest knowledge about tumours cytogenetics, targeted biological therapy against particular molecular targets (biomakers) in tumour cells has been adopted in clinical praxis. Essence of targeted treatment consists in influencing only tumours cells and increasing surviving rate of patients with lung carcinoma. Several biomakers have been identified in NSCLC against which it was managed to develop and implement in praxis targeted preparations. Mutations of EGFR gene and RAS gene family, gene transformation of ALK and ROS1 have became routinely investigated. Genomic testing has contributed to discover of further molecular changes in gene transformation of RET, amplification MET and activating BRAF and HER2 mutations, which seem to be like potential biomakers for further therapies.

The main aim of bachelor thesis was analysis of molecular biomakers by patients with NSLC, which could propose effective treatment. The method FISH (fluorescence *in situ* hybridization) is commonly used in clinical practice to examine genetic alternations. This method was implemented by examinations of genes EGFR, ALK and ROSI by 40 patients. The gain of this thesis was examination of potential predictive biomakers RET and NTRK1 and also advisement of correlation between identified mutations of genes and clinical-pathological data of patients.

Pod'akovanie

„Rada by som pod'akovala v prvom rade svojej školiteľke a vedúcej bakalárskej práce Mgr. Jane Potočkovej za odborné vedenie, ochotu, lojalitu, trpezlivosť a čas, ktorý mi venovala počas pracovania v laboratóriu aj mimo pracoviska. Taktiež by som chcela pod'akovať celému kolektívu ľudí z Oddelenia cytogenetiky na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny v Olomouci, ktorí ma medzi seba prijali a vytvorili mi priateľskú atmosféru pri práci, menovite pani Soni Mlčochovej za pomoc a ústretovosť pri osvojovaní si metodických postupov. V neposlednom rade by som rada vyslovila pod'akovanie svojej rodine za podporu počas celého priebehu štúdia.“

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cieľ práce.....	3
3. Súčasný stav riešenej problematiky.....	4
3.1 Molekulárna genetika.....	4
3.1.1 Nádorová cytogenetika.....	4
3.1.2 Transformácia buniek.....	5
3.1.3 Chromozómové prestavby spojené s rozvojom nádorového ochorenia.....	6
3.2 Molekulárne metódy v cytogenetickej analýze.....	7
3.2.1 Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia (FISH) a jej modifikácie.....	8
3.2.2 Komparatívna genómová hybridizácia a jej modifikácie.....	10
3.3 Pľúcny karcinóm.....	12
3.3.1 Rizikové faktory.....	13
3.3.2 Nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC).....	14
3.3.3 Štandardné terapeutické postupy.....	15
3.3.4 Konvenčná chemoterapia.....	16
3.3.5 Molekulárne biomarkery a cielená biologická terapia.....	17
3.4 EGFR.....	19
3.4.1 Receptorová signalizácia.....	19
3.4.2 Mutácie génu EGFR.....	21
3.4.3 Cílená liečba a EGFR inhibítory.....	21
3.5 ALK.....	23
3.5.1 Chromozómové prestavby génu ALK u NSCLC.....	23
3.5.2 ALK inhibítory.....	25
3.6 ROS1.....	26
3.6.1 Prestavby ROS1 a cielená liečba.....	26
3.7 RET.....	28
3.7.1 KIF5B/RET fúzny gén	28
3.8 NTRK1.....	30
3.8.1 Prestavby génu NTRK1 identifikované u NSCLC.....	30
4. Experimentálna časť.....	32
4.1 Materiál.....	32
4.2 Metodika.....	37
5. Výsledky.....	43
6. Diskusia.....	54
7. Záver.....	57
8. Zoznam použitej literatúry.....	58
9. Zoznam použitých skratiek.....	65

1. Úvod

Ľudský organizmus je neustále vystavený vplyvu mnohých exogénnych a endogénnych činiteľov, ktorých účinok môže byť priaznivý alebo naopak negatívny. Veľkou skupinou činiteľov rôznej povahy, ktoré škodlivo pôsobia na človeka sú mutagénny. Vplyvom akéhokoľvek mutagénnu môže dôjsť k zmene genetickej informácie. Po nahromadení zmien v somatických bunkách organizmu sa stáva, že tieto zmeny vedú k transformácii buniek v nádorové. Pokiaľ sa bunky následne vymknú spod kontroly regulačných mechanizmov vo výsledku môže dochádzať k zvýšenej proliferácii a vývoju nádorového ochorenia.

Medzi nádorové ochorenia s najhoršou prognózou a celosvetovo najvyššou mortalitou patrí pľúcny karcinóm. Z novo diagnostikovaných rakovinových ochorení tvorí pľúcny karcinóm až 14 % (www.cancer.org). Rakovina pľúc je považovaná za ochorenie vyššieho veku, priemerný vek pacientov pri stanovení diagnózy je okolo 70 rokov, avšak ani prípady mladších pacientov nie sú ojedinelé. Zhubné nádory vyrastajú najčastejšie z buniek prieduškovej sliznice, zo žliaz v stene priedušiek alebo z pľúcnych alveol. Nepriaznivá prognóza je spôsobená faktom, že v čase diagnózy sú pacienti väčšinou v pokročilom štádiu ochorenia. Vo väčšine prípadov je neskoré stanovenie diagnózy zapríčinené zanedbaním prvotných príznakov zo strany pacienta. Počiatočné príznaky sú často nenápadné a výrazne sa neodlišujú od príznakov bežných nenádorových ochorení dýchacích ciest a pľúc. Typicky ide o chronický kašeľ, zápal priedušiek, dušnosť, bolesť na hrudníku či sťažené prehĺtanie.

Početné výskumy preukázali, že najdôležitejšou príčinou vzniku rakoviny pľúc a jej rapídneho vzostupu v priebehu niekoľkých dekád je fajčenie cigariet. Až 90 % pacientov, ktorí karcinómu pľúc podľahli boli silní fajčiari. Významný vplyv má inhalácia škodlivých organických a neorganických zlúčenín z prostredia, ale aj dedičné faktory.

V prípade možnosti sa ako liečebný postup volí chirurgické odstránenie nádorového tkaniva, základnými postupmi sú tiež ožarovanie (rádioterapia) a konvenčná chemoterapia. V posledných rokoch sa upriamuje veľká pozornosť na cieľnú biologickú liečbu. Tento postup využíva najmodernejšie poznatky z oblasti molekulárnej biológie bunky a cytogenetiky. Princíp cielenej liečby v ideálnom prípade spočíva v účinku liečiv na molekulárne ciele špecifické pre dané ochorenie. Ovplyvnené by mali byť len nádorové bunky a minimálne zvyšné bunky organizmu. Problémom cielenej liečby je vysoká heterogenita v rámci prípadov s rovnakou diagnózou a pozitívna odpoveď na liečbu býva

evidovaná u 30 % pacientov (Foretová *et al.*, 2014). Cílenú liečbu nemožno aplikovať plošne, pretože pacienti vzhľadom na odlišný genetický profil by z nej nemali rovnaký profit. Molekulárnymi cieľmi v prípade karcinómu pľúc sú mutácie génu EGFR a prestavba génu ALK a ROS1, proti ktorým sú v klinickej praxi používané špecifické preparáty, takzvané tyrozínkinázové inhibítory (TKI).

Cieľom súčasného výskumu v oblasti nádorovej cytogenetiky je identifikácia a potvrdenie nových molekulárnych biomarkerov, ktoré by našli uplatnenie pri predikcii a zvýšení účinnosti liečby rôznych typov malignít.

2. Cieľ práce

Teoretická časť

Spracovanie literárnej rešerše pojednávajúcej o cytogenetických zmenách na úrovni chromozómov a ich vplyve na rozvoj nádorového ochorenia. Opísanie konkrétnych chromozómových aberácií identifikovaných u NSCLC, ich význam a analýza pri diagnostike a cielených terapeutických postupoch.

Experimentálna časť

Osvojiť si metódu FISH ako prístupu k detekcii chromozómových aberácií u pacientov s karcinómom pľúc. Pripraviť a overiť duálnu, fluorescenčne značenú, DNA próbu CEP7/EGFR pri analýze mutácií génu EGFR. Vyšetrit' súbor 40 pacientov s NSCLC na možnú prítomnosť alternácií v rutinne vyšetrovaných génoch EGFR, ALK, ROS1 a zároveň génov RET a NTRK1 ako potenciálnych prediktívnych biomarkerov pri diagnostike. Zhodnotiť dosiahnuté výsledky a pokúsiť sa nájsť korelácie medzi výsledkami a klinicko-patologickým profilom pacienta.

3. Súčasný stav riešenej problematiky

3.1 Molekulárna genetika

Aj napriek tomu, že sa molekulárna genetika radí medzi relatívne mladé vedné odbory, rozsah poznatkov a informácií, ktoré zahŕňa nie je vôbec zanedbateľný a za pár desiatok rokov ich nadobudla fascinujúce množstvo. Vývoj molekulárnej genetiky je tesne spätý s rozvojom samotnej molekulárnej biológie, preto je mnohokrát v odbornej literatúre uvádzaná ako jej odnož. V molekulárnej biológii a rovnako aj v molekulárnej genetike sa pozornosť upriamuje na funkciu, štruktúru, usporiadanie a správanie takzvaných informačných makromolekúl. Pojem informačné makromolekuly označuje nukleové kyseliny a proteíny, ktoré vo svojich primárnych štruktúrach uchovávajú všetku informáciu o živom systéme. Samotný pojem cytogenetika je v súčasnosti skôr chápaný ako dynamicky sa rozvíjajúce odvetvie genetiky, zamerané na štúdium evolúcie, počtu a morfológie buniek a bunkových štruktúr, primárne chromozómov ako nositeľov genetickej informácie zakódovanej v molekule DNA. V prípade numerických alebo štruktúrnych zmien na chromozómovej úrovni sa hovorí o chromozómových aberáciách. Chromozómové aberácie v jadrách buniek môžu mať za následok problémy asociované s vývinom, rastom, biologickými funkciami organizmov, dokonca s infertilitou a v prípade človeka môžu zohrávať zásadnú rolu pri rozvoji konkrétnej choroby. Potvrdenie korelácie medzi zmenami na úrovni chromozómov a rozvojom určitého ochorenia viedlo v nedávnych rokoch k zvýšenému záujmu o túto vednú disciplínu a výskumné aplikácie v oblasti cytogenetiky začali rýchlo napredovať. Zároveň vzniklo niekoľko špecializovanejších odvetví, zameraných na problematiku konkrétneho odboru, ktoré majú cytogenetický základ. Sú nimi už spomínaná molekulárna, humánna, klinická či nádorová cytogenetika.

3.1.1 Nádorová cytogenetika

Jedno z najdôležitejších uplatnení a význam našli cytogenetické analýzy vzhľadom na kvalitu života človeka v medicínskych odboroch. Na popredné miesto odborov využívajúcich cytogenetické metódy patrí onkológia. Nevyhnutnosť analýz a dôležitosť získaných poznatkov spojených s nádorovými ochoreniami viedli k založeniu

samostatnej disciplíny, ktorou je dnes onkogenetika alebo tiež nádorová cytogenetika. Nádorová cytogenetika je definovaná ako obor zameraný na chromozómové zmeny v bunkách transformovaných na nádorové. Ide hlavne o získané a klonálne zmeny, ktoré súvisia s určitým typom nádorového ochorenia a sú prítomné ako u solídnych (pevných) tumorov, tak v rovnakej miere aj u hematologických malignít. Najčastejšie sa vyskytujúce numerické chromozómové aberácie, ktoré odpovedajú týmto typom ochorení sú aneuploidie. Na štruktúrnej úrovni sú to delécie a translokácie, a pokiaľ dôjde k zmnoženiu určitého génu ide o amplifikácie (Halling *et al.*, 2007).

V prípade solídnych tumorov sú zmeny na chromozómovej úrovni znakom génovej dysregulácie a genómovej nestability (Albertson *et al.*, 2003). Postupný rozvoj cytogenetických metód viedol k urýchleniu a sprístupneniu analýz nie len v oblasti klinického výskumu, ale hlavne v diagnostike. V posledných rokoch nadobudli molekulárno-genetické analýzy ešte väčší význam, pretože okrem diagnostických stratégií či klasifikácie nádorov a prevencie sa čoraz častejšie presadzujú v stanovení prediktívnych biologických biomarkerov. Na základe týchto biomarkerov je u onkologických pacientov následne indikovaný vhodný liečebný postup a neskôr pomocou nich môže byť sledovaná odpoveď na nastavenú liečbu (Albertson *et al.*, 2003).

3.1.2 Transformácia buniek

Transformácia bunky na nádorovú sa typicky odohráva prostredníctvom dysregulácie génovej expresie, dôsledkom čoho bunka prestáva reagovať na podnety zo svojho okolia a nadobúda zvýšenú schopnosť prežívať a nekontrolovane proliferovať. Charakteristickým znakom nádorovej bunky je schopnosť vo veľkej miere exprimovať proteíny, ktoré jej udeľujú rezistenciu voči apoptóze. Väčšina solídnych tumorov je výsledkom delenia jednej malígnej bunky. Medzi gény podieľajúce sa na transformácii bunky v nádorovú a procese karcinogenézy patria protoonkogény, tumor-supresorové gény a gény regulačné, kódujúce opravné mechanizmy. Komplexné genetické prestavby stoja často za aktiváciou protoonkogénov a tým prispievajú k rozvoju nádorového ochorenia (Sandberg *et al.*, 2010). Iným mechanizmom býva potlačenie správneho fungovania tumor-supresorových génov určitou mutáciou, často deléciou, čím nadobúdajú onkogénny potenciál. Alternácie tumor-supresorových génov sú často identifikované u hereditárnych foriem malignít.

3.1.3 Chromozómové prestavby spojené s rozvojom nádorového ochorenia

Významným objavom z hľadiska humánnej cytogenetiky bolo potvrdenie z roku 1956, že ľudské somatické bunky obsahujú vo svojich jadrách 23 párov chromozómov, teda dokopy 46 chromozómov (Tjio *et* Levan, 1956). Správne stanovenie diploidného počtu ľudských chromozómov umožnilo v nasledujúcich rokoch lepšie porozumieť a preukázať vzťah medzi abnormalitami na chromozómovej úrovni a nádorovým bujnením. Prvá chromozómová prestavba asociovaná s onkologickým ochorením bola identifikovaná u chronickej myeloidnej leukémie (CML) a predstavovala reciproknú translokáciu medzi chromozómom 9 a 22, ktorá viedla k vzniku štruktúry známej pod názvom „Filadelfský (Ph) chromozóm“ (Nowell *et* Hungerford, 1960). Výsledkom prestavby je fúzny gén BCR/ABL1, ktorý kóduje proteín stimulujúci bunky myeloidnej línie k zvýšenej proliferácii.

Nádor býva považovaný za genetické ochorenie. Aneuploidie ako dôsledok straty, fragmentácie alebo rearanžovania chromozómov možno detegovať u väčšiny malignít. Na úrovni chromozómov môže dochádzať k zisku alebo strate genetického materiálu, vtedy sa hovorí o chromozómových duplikáciách alebo deléciách. Ak dochádza k prestavbe genetického materiálu, ale zároveň ostáva kvantitatívne zachovaný ide o balansované translokácie. Výsledkom takýchto translokácií je typicky fúzny proteín indukujúci nádorovú transformáciu buniek.

Od polovice 70. rokov bolo identifikovaných mnoho chromozómových alternácií, ktoré umožňujú charakterizovať špecifické subtypy onkologických malignít. V súčasnosti je známych niekoľko stoviek génov zhrnutých v Mitelmanovej databáze (Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer), ktoré sú dôsledkom chromozómových aberácií a pomáhajú určiť konkrétny novotvar.

3.2 Molekulárne metódy v cytogenetickej analýze

Cytogenetické prístupy štúdia na úrovni chromozómov a konkrétnych génov získali dôležité postavenie pri diagnostike a analýze ľudských ochorení. Hlavným cieľom je určiť pozíciu génov na chromozómoch, umožniť vyšetrenie akéhokoľvek tkaniva (vrátane nádorového), identifikovať bunky, u ktorých došlo k strate alebo zisku chromozómov či kópií génov. Zároveň je potrebné zistiť, či sa v bunkách nevyskytla translokácia, ktorá zahrnula určitú skupinu chromozómov.

Zhubné nádorové ochorenia sú vážny celospoločenský problém a čas od záchytu ochorenia a stanovenia vhodnej liečby hrá u pacientov podstatnú úlohu. S týmto nárokom rástla potreba poznať mechanizmus karcinogenézy a patofyziológie nádorových ochorení, čo sa odzrkadlilo na zdokonalení technologických postupov. Výsledkom je postupné aplikovanie nových metód štúdia do praxe v oblasti genetiky, molekulárnej biológie a chémie.

Zavedenie hybridizačných *in situ* (ISH) techník sa stalo spoločným základom súčasných metód pri cytogenetickom vyšetrení. Ich princíp spočíva vo využití možnosti denaturácie molekuly DNA a spätnej renaturácie jednovláknových DNA na základe komplementarity dusíkatých báz. Pri *in situ* hybridizácii dochádza pri vhodných podmienkach k denaturácii cieľovej DNA a následnej hybridizácii s jednovláknovými úsekmi DNA (prípadne RNA) nazývanými DNA próby (DNA probes). DNA próby rozpoznávajú konkrétne sekvencie na vyšetrovanej DNA a s vysokou špecifickosťou s nimi hybridizujú priamo v bunke alebo na histologickom reze fixovanom na sklíčku (*in situ*). Pred samotným procesom hybridizácie je nevyhnutné vhodne označiť hybridizačné próby. Z počiatku sa próby značili rádioaktívne použitím izotopov trícia, jódu či síry a následne sa vizualizovali na fotografickej emulzii. Metóda zavedená od konca 60. rokov bola prvýkrát aplikovaná na cytologických preparátoch s použitím rádioaktívne značenej repetitívnej DNA próby (Gall et Pardue, 1969). Malá citlivosť, možnosť lokalizovať len vysoko repetitívne a amplifikované sekvencie a dlhá doba expozície pri detekcii u rádioaktívne značených prób, to a ďalšie limity viedli k nahradeniu prvotných postupov za postupy nerádioaktívneho značenia. Hybridizáciu prób je tak možno vizualizovať nepriamou alebo priamou imunofluorescenciou pomocou fluorescenčných mikroskopov.

3.2.1 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) a jej modifikácie

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia, ktorá je modifikáciou ISH, sa zameriava na molekulárno-cytogenetickú charakterizáciu chromozómov v jadrách buniek vyšetřovaného tkaniva. Principiálne spočíva v hybridizácii jednej, alebo viacerých fluorescenčne značených DNA prôb na segment cieľovej DNA alebo vyšetřovaný gén. Je to veľmi citlivý spôsob analýzy s vysokou špecifickosťou, umožňujúci hodnotenie karyotypu, detekciu numerických a štruktúrnych zmien metafáznych, ale aj interfáznych chromozómov v nedeliacich sa jadrách buniek (Cremer *et al.*, 1986). Použitím FISH môže byť vyšetřené široké spektrum biologických vzoriek. Metóda FISH sa začala používať od konca 80. rokov minulého storočia, jej podstatou je identifikácia bunkových jadier s konkrétnu DNA sekvenciu pomocou fluorescencie (Rudkin *et Stollar*, 1977).

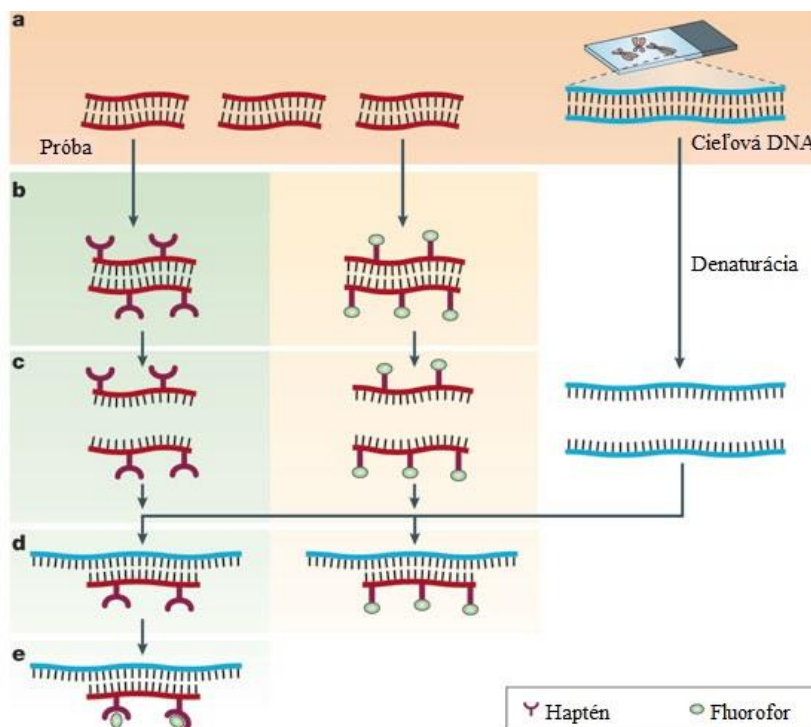
Fluorescenčné signály značených prôb sa následne vizualizujú nepriamym, alebo priamym spôsobom. Pri detekcii nepriamym spôsobom sa do DNA próby včlenenia chemicky zmenené nukleotidy (tymín nahradený dUTP), na ktoré sa kovalentne viaže biotín alebo digoxigenín a imunodetekcia je uskutočnená pomocou protilátok konjugovaných s príslušným fluoroforom (anti-DIG a anti-biotín protilátky). Pri priamej metóde detekcie sa do DNA próby včlenení dUTP s viazaným fluoroforom a cieľový úsek DNA možno vizualizovať bezprostredne po hybridizácii pomocou fluorescenčného mikroskopu s použitím filtrov odpovedajúcich vlnovej dĺžke excitácie fluoroforu.

Typy fluorescenčne značených prôb:

- **Lokusovo (génovo) špecifické próby (LSI, locus specific identifier)** hybridizujú na jedinečné sekvencie (vybraný lokus) vyšetřovanej DNA. Slúžia k stanoveniu počtu kópií určitého génu, jednotlivých oblastí chromozómov a k detekcii štruktúrnych aberácií, primárne delécií a duplikácií.
- **Próby zamerané na alfa-satelitné sekvencie centromér (CEP, centromeric enumeration probes) a telomér** rozpoznávajú tandemové repetície za sebou nasledujúcich identických alebo podobných sekvencií DNA. CEP próby umožňujú stanovenie počtu kópií daného chromozómu a využívajú sa ako referenčné próby k analýzam aneuploidií a polyploidií, ktorých výsledkom bývajú klamné počty signálov. Ich použitie je vhodné aj pri analýzach v nedeliacich sa interfáznych

jadrách (interfázová FISH, I-FISH) a v kombinácii s LSI próbami slúžia k detekcii straty genetického materiálu z určitého chromozómu.

- Próby hybridizujúce s mnohopočetnými chromozómovými sekvenciami označujú celé chromozómy alebo ich jednotlivé ramená. Nazývané aj **celochromozómové** alebo **maľovacie próby (WCP, whole chromosome painting)** sa pripravujú z rekombinantných DNA knižníc a sú použité za účelom identifikácie štruktúrnych prestavieb chromozómov.



Obrázok č. 1: Princíp metódy FISH. a, DNA próba a cieľová DNA vstupujúce do hybridizačnej reakcie. b, Stratégie značenia DNA próby. Pri nepriamom značení sú próby označené modifikovanými nukleotidmi s naviazaným hapténom a pri priamom sú inkorporované priamo modifikované nukleotidy s naviazaným fluoroforom. c, Denaturácia dvojvláknových prôb a cieľovej DNA. d, Kombinácia jednovláknovej próby s jednovláknovou DNA vedie k vzájomnému pripojeniu na základe komplementarity. e, Pri nepriamom značení je zaradený krok navyše, potrebný k vizualizácii pomocou enzymatického, alebo imunodetekčného systému. Zdroj: Prevzaté od Speicher *et* Carter, 2005.

Mnohofarebná karyotypizácia ľudských chromozómov (M-FISH, multicolor FISH) je jedna z najnovších modifikácií hybridizačných metód, umožňujúca odlíšiť 22 autozómov a X, Y chromozómov. Odlíšenie je zabezpečené rozdielnymi farbivami v jednej hybridizačnej reakcii, k čomu stačí kombinácia 5 fluoroforov (Schröck *et al.*, 1996; Speicher *et al.*, 1996). Používa sa pri identifikácii drobných, komplexných interchromozómových prestavieb a takzvaných marker chromozómov. Marker chromozómy sú väčšinou štruktúrne abnormálne, nadpočetné chromozómy, ktoré najčastejšie vznikajú dôsledkom zlomu väčších chromozómov.

Podobnou skriningovou metódou je **spektrálna karyotypizácia** (SKY) schopná farebne rozlíšiť jednotlivé páry autozómov a pohlavných chromozómov. Pri tejto metóde dochádza k hybridizácii mitotických chromozómov na preparáte so zmesou 24 špecifických celochromozómových prôb, ktoré sú značené piatimi rôzne kombinovanými fluoroformi. Každú próbu charakterizuje emisné spektrum, ku ktorému počítačový program priradí určitú „pseudofarbu“, čím identifikuje daný chromozóm. Využíva sa pri analýzach komplexných chromozómových abnormalít, prednostne translokácií (Nanjangud *et al.*, 2002).

3.2.2 Komparatívna genómová hybridizácia (CGH) a jej modifikácie

Komparatívna genómová hybridizácia (CGH) je metóda založená na princípe FISH a umožňuje v jednom kroku detekciu nebalansovaných chromozómových aberácií v rámci celého genómu. Princípom je rozdielne fluorescenčné značenie testovanej a referenčnej genómovej DNA, ktoré súčasne hybridizujú na referenčné metafázne chromozómy. Vyhodnotením sa získa vzájomný pomer intenzity signálov medzi dvoma porovnávanými genómami. Opísaný postup bol prvýkrát použitý v roku 1992 (Kallioniemi *et al.*, 1992). Oblasti delécií, duplikácií, amplifikácií sú zvýraznené rozdielnou farbou homológov, ktorú spôsobí zmena pomeru intenzity fluorochrómov. Hlavnou nevýhodou je neschopnosť detekcie recipročných translokácií, inverzií a inzercií, keď sa nemení pomer počtu kópií sekvencií DNA.

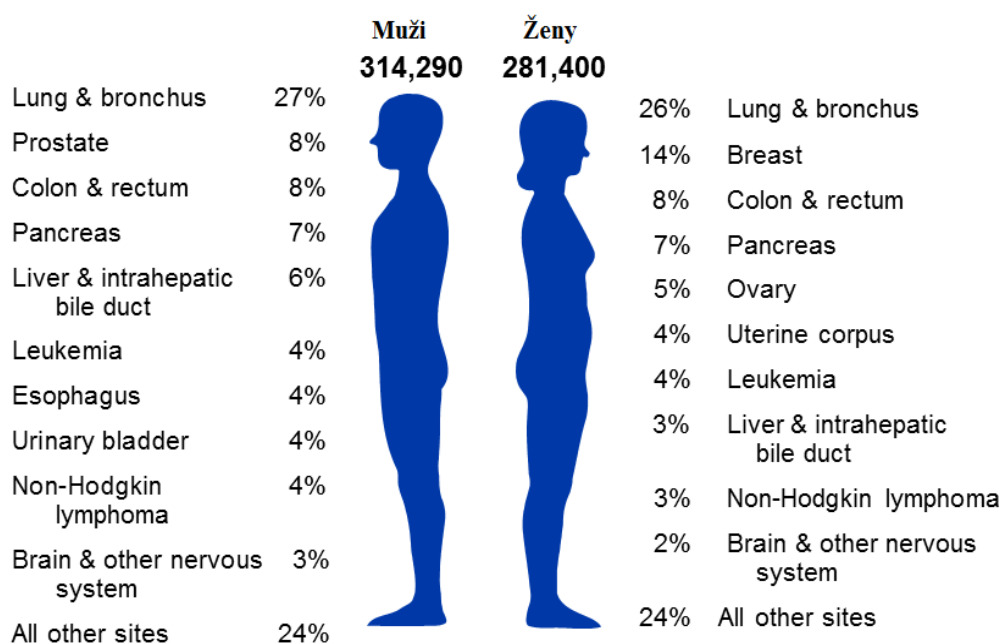
Zdokonalením CGH metódy je **array-CGH**, tiež označovaná **matrix CGH**, ktorej rozdiel spočíva v tom, že podklad pre hybridizáciu tvoria jednotlivé oligonukleotidy, ktoré predstavujú časti DNA alebo vybraných génov (Solinas-Toldo *et al.*, 1997). Tie sú následne roboticky „natlačené“ na podložnom sklíčku (mikročipy). Na preparáty je hybridizovaná rozdielne značená kontrolná a vyšetrovaná DNA a výsledné sfarbenie

políčka je dôkazom prítomnosti či neprítomnosti génu, alebo časti chromozómu. Napriek finančnej náročnosti má array-CGH technika veľký potenciál v klinickej diagnostike, už dnes sa využíva pri sledovaní vrodených subtelometrických delécií a sú pripravované mikročipy k identifikácii zmien u vybraných vrodených genetických syndrómov a v rade leukémií.

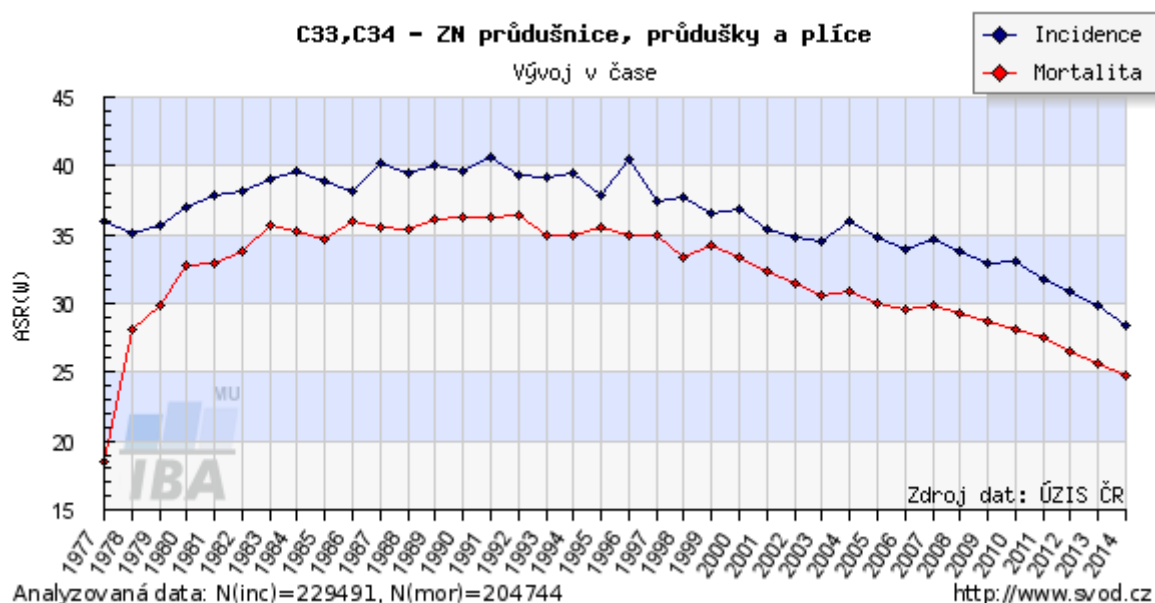
3.3 Pľúcny karcinóm

Rakovine pľúc patrí každoročne popredné miesta v celosvetových štatistikách úmrtností zapríčinených nádorovým ochorením. Podľa štatistiky z roku 2016 bolo v USA najviac úmrtí na rakovinu zapríčinených práve pľúcnym karcinómom. U mužov úmrtnosť dosiahla 27 % a u žien 26 % úmrtí v dôsledku rakoviny (Cancer Statistics 2016, dostupné na www.cancer.org).

Vysoká frekvencia mortality spôsobená týmto typom ochorenia je evidovaná hlavne u mužov, ale za posledné roky dochádza k evidentnému vzostupu výskytu aj u žien. Príčinou nelichotivej prognózy je skutočnosť, že väčšinou sa rakovina zachytí v pokročilom štádiu (štádium III – IV), keď radikálne chirurgické odstránenie tumoru už nie je možné. Tento trend má za následok, že miera prežitia pacientov je aj napriek moderným terapeutickým postupom veľmi nízka. Viac ako polovica pacientov po stanovení diagnózy umiera v priebehu roka a prežitie do piatich rokov je len v 17,8 % prípadov (National Cancer Institute, seer.cancer.gov). Pľúcny karcinóm je považovaný za ochorenie vyššieho veku, najčastejšia veková skupina pacientov je 70-79 rokov, v kategórii osôb nad 80 rokov je incidencia až 14 % (Owonikoko *et al.*, 2007).



Obrázok č. 2: Odhadované percentá úmrtí v dôsledku rakovinového ochorenia za rok 2016 v rámci USA. U mužov mortalita 27 % a u žien 26 % odpovedá karcinómu pľúc a priedušiek. Zdroj: Prevzaté z Cancer Statistics 2016, dostupné na www.cancer.org.



Graf č. 1: Incidencia a mortalita spojená so zhubnými nádormi priedušnice, priedušiek a pľúc na území Českej republiky za obdobie rokov 1977-2014. Zdroj: Prevzaté a dostupné na www.svod.cz.

3.3.1 Rizikové faktory

Na rozvoj rakoviny pľúc má vplyv široké spektrum socio-enviromentálnych, ale aj početné množstvo genetických faktorov. Hlavným rizikovým faktorom v rozvoji pľúcneho karcinómu je fajčenie cigariet, ktoré je najmenej u 80 % pacientov zároveň príčinou smrti (Zappa *et* Mousa, 2016). Rizikové je tiež pasívne fajčenie u osôb, ktoré nikdy nefajčili, ale pracujú a žijú vo fajčiarskom prostredí. Podľa U.S. Department of Health & Human Services spolužitie s fajčiarom zvyšuje u nefajčiara pravdepodobnosť rozvoja rakoviny pľúc o 20 – 30 % (surgeongeneral.gov). Zvýšená náchylnosť na rozvoj pľúcneho karcinómu súvisí aj s určitými profesiami, v ktorých dochádza k expozícii radónu, chlóru, vinylchloridu, berýliu, arzenu, niklu a ich zlúčeninám. Bola preukázaná spojitosť medzi používaním azbestu v priemyselnej výrobe a stavitelstve so zvýšenou incidenciou mezoteliómu a pľúcneho karcinómu (Hodgson *et* Darnton, 2000). Rovnako aj v priemyselných regiónoch veľkých miest a v oblastiach s hustou dopravou, kde dochádza k dlhoročnej akumulácii emisií a k znečisteniu ovzdušia zlúčeninami polycyklických aromatických uhlíkovodíkov je preukázané vyššie riziko rozvoja rakoviny. V neposlednom rade netreba zabúdať ani na vplyv geneticky podmienených faktorov. Prínosom v tejto oblasti bola americká štúdia, ktorá prebehla medzi rokmi 1944 až 1975. Cieľom štúdie, ktorej sa zúčastnilo 1263 osôb z 97 rodín bolo preukázanie korelácie medzi mutáciou

tumor-supresorového génu TP53 v bunkách zárodočnej línie a zvýšenou náchylnosťou k rozvoju rakoviny. Vďaka výsledku, že u osôb s prítomnou mutáciou, ktorí boli zároveň fajčiari bolo riziko rakoviny pľúc trojnásobne vyššie, než u nefajčiarov s mutáciou, autori dospeli k záveru, že vzácne genetické skupiny mutácií môžu zvýšiť riziko prepuknutia pľúcneho karcinómu (Hwang *et al.*, 2003).

3.3.2 Nemalobunkový karcinóm pľúc

Z klinického hľadiska je rakovina pľúc veľmi heterogénne nádorové ochorenie, ktoré zahŕňa početné histologické subtypy. Podľa mikroskopického vzhladu nádorových buniek sa rozlišujú dve základne formy, konkrétne malobunkový (SCLC, small cell lung cancer) a nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC, non small cell lung cancer). Nemalobunkový karcinóm je najčastejším typom a býva identifikovaný až v 80 % prípadov (www.cancer.org). K šíreniu nemalobunkového karcinómu v ľudskom organizme dochádza skrz lymfatické uzliny v pľúcnom hľe a blízkosti priedušnice v medzihrudí, alebo prostredníctvom obehového systému. Z postihnutých uzlín pokračuje šírenie do uzlín vzdialenejších a následne do ďalších životne dôležitých orgánov ako mozog, obličky a pečeň. Ak nádor metastázuje do kostí môže spôsobiť rozrušením kostného tkaniva ich fraktúru. Hlavné histologické subtypy, ktoré spadajú pod nemalobunkový karcinóm sú:

- adenokarcinóm (vrátane bronchioloalveolárneho karcinómu a iné)
- skvamocelulárny (dlaždicovobunkový) karcinóm
- veľkobunkový nediferencovaný karcinóm.

Histopatológia:

Adenokarcinóm býva diagnostikovaný až v 40 % prípadov (www.cancer.org), ide o najviac sa vyskytovanú formu solídneho pľúcneho nádoru, ktorý prevažuje u žien, nefajčiarov a pacientov s nižšou vekovou hranicou. Adenokarcinómy vyrastajú z buniek žliaz v stenách priedušiek, preto je pre ne charakteristická žľazovitá štruktúra a produkcia hlienu. Sú typické pomalším rastom a bývajú objavené skôr než sa rozšíria do oblastí mimo pľúcne tkanivo. Adenokarcinómy sú zvyčajne lokalizované na periférnych častiach pľúc. Táto skutočnosť sa vysvetľuje tým, že v prípade fajčiarov zachytávajú

cigaretové filtre väčšie škodlivé častice a zabraňujú im preniknúť do pľúc. Dochádza k hlbšej inhalácii cigaretového dymu a vzniku periférnych lézií.

Skvamocelulárny karcinóm, niekedy označovaný ako epidermoidný, tvorí 25-30 % (www.cancer.org) nádorových ochorení pľúc. Nádor vyrastá zo skvamózných buniek nachádzajúcich sa v epiteli priedušiek, preto býva lokalizovaný v centrálnej časti pľúc. S umiestnením nádoru súvisia hlavné príznaky, medzi ktoré patrí kašeľ, prítomnosť krvi vo vykašľanom hliene, ťažkosti s dýchaním a bolesť na hrudníku. U tohto subtypu bola preukázaná silná korelácia s fajčením cigariet (Kenfield *et al.*, 2008). Skvamocelulárny karcinóm sa môže šíriť cez stenu priedušiek a tvoriť metastázy v mozgu, stavcoch chrbtice, nadobličkách a v pečeni.

Veľkobunkový nediferencovaný karcinóm je vzácnym typom rakoviny pľúc a predstavuje 5-10 % (www.cancer.org) pľúcnych karcinómov. Je typický rýchlejším rastom a agresívnejším šírením už v počiatočných štádiách ochorenia. Lokalizovaný býva najčastejšie v centrálnej časti pľúc. Veľkobunkový karcinóm vykazuje okrem jednoznačného vzťahu s fajčením cigariet aj koreláciu s dĺžkou obdobia (počet rokov), počas ktorého bol pacient aktívnym fajčiarom (Muscat *et al.*, 1997).

3.3.3 Štandardné terapeutické postupy

Včasné stanovenie diagnózy a presné určenie histologického subtypu pľúcneho karcinómu umožňuje správne zvoliť efektívny liečebný postup. U väčšiny onkologických ochorení sa volí buď kuratívna forma liečby, alebo forma paliatívna. Kuratívna forma zahŕňa radikálne postupy, preto je voľbou prevažne v prvotných štádiách ochorenia a cieľom je vyliečenie pacienta. Naopak pri paliatívnej liečbe sa rekonvalescencia nepredpokladá kvôli pokročilejšiemu štádiu, zmyslom liečby je zmiernenie príznakov a bolesti spôsobených ochorením, poprípade predĺžiť život pacienta.

Radikálna resekcia nádorového tkaniva sa považuje za najefektívnejšiu metódu, avšak je možná len u menších nádorov, ktoré sa nerozšírili do okolitých tkanív. O chirurgickom odstránení nádoru rozhoduje klinické štádium ochorenia, histologické vyšetrenie a celková kondícia pacienta. Chirurgickým zákrokom sa môže odstrániť len nádor a jeho bezprostredné okolie, celý pľúcny lalok (lobektómia) alebo celé pľúcne krídlo (pulmonektómia). Operačný postup sa často kombinuje s ožarovaním (rádioterapiou) a konvenčnou chemoterapeutickou liečbou. Rádioterapia a chemoterapia môžu byť

zavádzané pred samotným zákrokom za účelom zmenšiť nádor, v takom prípade ide o neoadjuvantnú liečbu. Pri pooperačnom zavedení s cieľom zničiť nádorové bunky, ktoré mohli ostať v organizme sa hovorí o liečbe adjuvantnej.

Rádioterapia využíva röntgenové (RTG) alebo iné vysokoenergetické žiarenie, ktoré má deštruktívny účinok na DNA rakovinových buniek. Zabraňuje ich rastu, deleniu a účinne ich ničí. Radiačná terapia býva radikálna u menších a vhodne lokalizovaných nádorov, alebo súčasťou paliatívnej liečby zlepšujúcej kvalitu života pacientov, ktorí z interných príčin nemôžu podstúpiť operačný zákrok alebo ho odmietajú. V skorých štádiách nemalobunkového karcinómu pokiaľ je nádor relatívne malý a nerozšíril sa do okolitých lymfatických uzlín sa najčastejšie indikuje extrakraniálna stereotaktická rádioterapia (SBRT) (Prietelová *et al.*, 2013). Stereotaktická rádioterapia je technika, ktorou sa dodávajú vysoké dávky žiarenia s vysokou konformitou v malom počte. Biologicky efektívna dávka (BED), ktorá sa používa je vyššia ako 100 Gy. Mnohopočetné ožarovacie lúče smerujú na cieľové nádorové tkanivo v rôznych rovinách a v mieste prekríženia sa dosahuje požadovaná dávka. Táto metóda umožňuje presne umiestniť a vypočítať dávku v cieľovom mieste a je šetrnejšia k okolitým zdravým tkanivám.

3.3.4 Konvenčná chemoterapia

Plúcne karcinómy sú vo všeobecnosti mierne citlivé na konvenčnú chemoterapeutickú liečbu. Tá využíva chemické látky s cytostatickým účinkom, ktoré spomaľujú rast a usmrcujú rýchlo deliace sa nádorové bunky, avšak vedľajším účinkom je pôsobenie na zdravé bunky organizmu, primárne intenzívne proliferujúce bunky kostnej drene, tráviacej sústavy a vlasových folikulov. U pacientov preto dochádza k poklesu tvorby krvných buniek, zvýšenej krvácanosti, žalúdočnej nevoľnosti a nauzey či strate vlasov a ochlpenia. Snaha potlačiť negatívne účinky chemoterapie viedla k vývoju takzvaných monoklonálnych protilátok, ktoré špecificky rozoznávajú nádorové bunky podľa povrchových štruktúr od buniek nenádorových. Chemoterapeutiká sa podávajú v cykloch s určitými intervalmi, v priebehu ktorých sa organizmu čiastočne zotaví z cytotoxických účinkov. Forma podania liekov býva intravenózna, subkutánna, intramuskulárna, perorálna v podobe tabliet a kapsúl alebo je podaná priamo do telesných dutín. Pacientom s nemalobunkovým karcinómom sú obecné podávané chemoterapeutiká na báze platiny,

alebo taxánov. Medzi najznámejšie preparáty patrí cisplatina, karboplatina, pemetrexed, paklitaxel, docetaxel, gemcitabin, etopozid, vinblastin či cetuximab.

3.3.5 Molekulárne biomarkery a cielená biologická terapia

Genetické zmeny môžu špecificky asociovať s predispozíciou, genézou, progresiou alebo rozšírením metastáz u rôznych druhov nádorov. Na identifikáciu kľúčových genetických abnormalít, označovaných ako molekulárne biomarkery, je zameraná veľká časť výskumných aplikácií v oblasti onkogenetiky. Pojem biomarker definuje detekovateľné zmeny v DNA, RNA, proteínoch či lipidoch, ktoré môžu byť využité na potvrdenie a diagnostiku rakoviny pľúc, určenie prognózy, výber optimálneho liečebného režimu a predikciu reakcie pacienta na stanovenú liečbu. Zavádzanie biomarkerov do klinickej praxe umožňuje individuálny prístup k pacientovi za účelom zvýšiť šancu na prežitie a vyhnúť sa neefektívnym liečebným postupom, ktoré by pacienta zbytočne zaťažovali (Bhatt *et al.*, 2010).

Význam cielenej biologickej liečby spočíva v zavedení látok a postupov, ktoré sú špecificky mierené proti konkrétnym biomarkerom charakteristickým pre nádorové tkanivo. Zároveň by mali byť bez vplyvu, alebo iba minimálne účinkovať aj na zdravé bunky. V ideálnom prípade by mali ničiť výhradne rakovinové bunky, vykazovať vyššiu účinnosť a menej vedľajších účinkov než konvenčná chemoterapia.

U nemalobunkového karcinómu bolo za posledné roky identifikovaných niekoľko významných prognostických, prediktívnych a diagnostických biomarkerov, ktoré umožňujú zvoliť účinnú liečbu. Dnes už sú rutinne vyšetrované amplifikácie génu EGFR, mutácie členov génovej rodiny RAS a prestavby génov ALK a ROS1, voči ktorým boli úspešne vyvinuté a americkým Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) schválené liečebné preparáty. Keďže cielene blokujú povrchové enzýmy nádorových buniek, takzvané tyrozínkinázy, ktoré sú v bunkách súčasťou signálnych dráh spojených s rastom, sú tieto preparáty označované ako tyrozínkinázové inhibítory (TKI). Moderné genomické analýzy umožnili objavovanie nových genetických zmien akými sú prestavby génu RET, amplifikácia génu MET či aktivačné mutácie génov BRAF a HER2, ktoré majú do budúca veľký potenciál uplatniť sa v terapeutických postupoch.

Tabuľka č.I: Cielená liečba vybraných genetických aberácií u karcinómu pľúc.

Molekulárny biomarker	Chromozómová aberácia	Cielená biologická liečba	Frekvencia výskytu [%]
EGFR	mutácia / amplifikácia	gefitinib, erlotinib, cetuximab	10-25 (35 % u Ázijcov)
HER2	mutácia / amplifikácia	trastuzumab	5-10
BRAF	mutácia	sorafenib	2-3
p53	mutácia / delécia	advexin	30-50
VEGF	zvýšená expresia	bevacizumab, afibercept	zdroj neuvádza
PI3K	modifikácia a aktivácia	BEZ235, LY294002	1-3
mTOR	aktivácia	rapamycin, RAD001, CCL-779	70-75
RAS	aktivácia	tipifarnib, lona-farnib	10-15
adenokarcinóm			20-30
MEK	aktivácia	trametinib, salumetinib	1-2
c-KIT	zvýšená expresia	imatinib	1-2
EML4/ALK	fúzia	crizotinib	5-13

Zdroj: Prevzaté a spracované podľa Palmer *et al.*, 2014.

3.4 EGFR (receptor epidermálneho rastového faktora)

EGFR (epidermal growth factor receptor) označovaný tiež ako ErbB1 a HER1 je transmembránový glykoproteín exprimovaný v normálnych epiteliálnych tkanivách, ktorý má relatívnu molekulárnu hmotnosť od 170 do 185 kDa. Proteín EGFR patrí do rodiny ErbB tyrozínkinázových receptorov (rodina ErbB/HER), spoločne s receptormi ErbB2/HER2/*neu* (HER2), ErbB3/HER3 a ErbB4/HER4. Štruktúrne sú proteíny tejto rodiny zložené z N-terminálnej na cysteín bohatej extracelulárnej domény viažucej ligand, hydrofóbnej transmembránovej domény a vysoko konzervatívnej C-terminálnej intracelulárnej domény s tyrozínkinázovou aktivitou, ktorá obsahuje niekoľko fosforylačných motívov.

Systém ErbB/HER receptorov má dôležitú úlohu pri udržovaní homeostázy vnútorného prostredia organizmu, pretože naviazaním odpovedajúceho ligandu na extracelulárnu doménu sa indukuje konformačná zmena receptorov a dochádza k aktivácii signálnych dráh spojených s bunkovým rastom, proliferáciou, diferenciáciou a prežívaním buniek. Je známych niekoľko ligandov, ktoré aktivujú proteíny ErbB/HER rodiny, ako napríklad ERF, TGF- α , amfiregulín (AR), betacelulín (BTC), HB-EGF, epiregulín (EPR) a neuregulíny (NRG). Konkrétne na EGFR sa špecificky viažu ligandy EGF, TGF- α , AR, BTC a EPR.

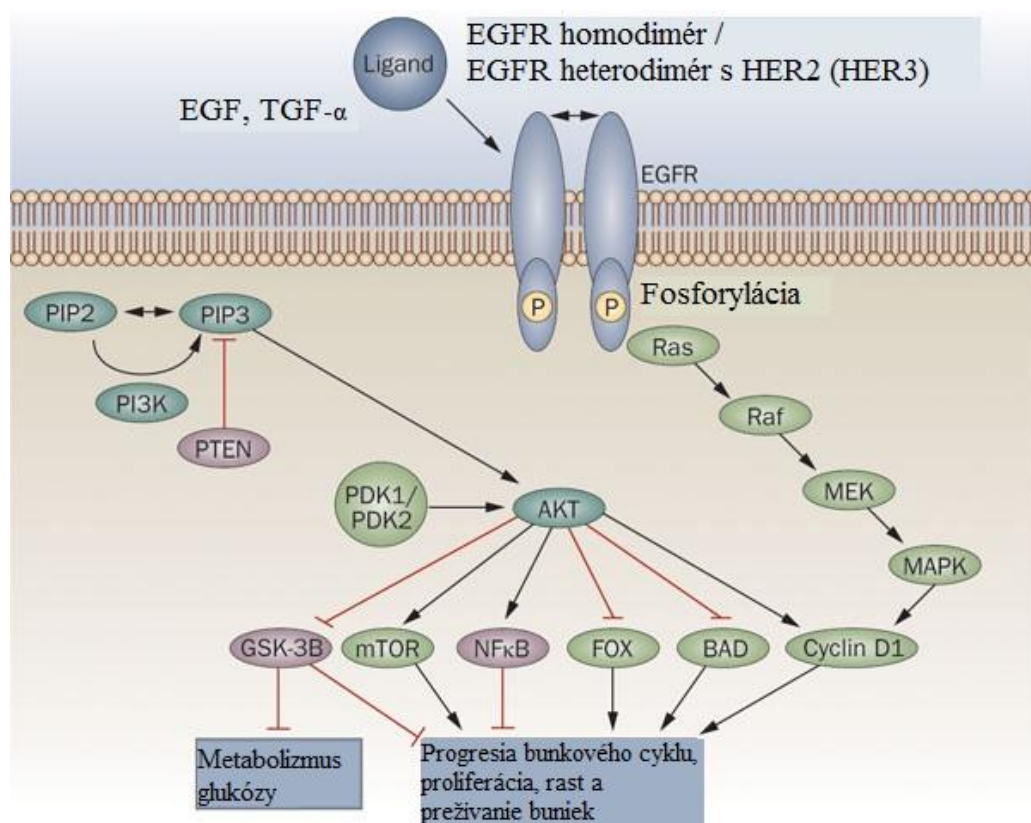
Gén kódujúci proteín EGFR je lokalizovaný v chromozómovej oblasti 7p12-13 a jeho expresia je prísne regulovaná. Zvýšenie aktivity vedie k progresii bunkového cyklu, nekontrolovanej proliferácii, nádorovej angiogenéze, invazivite a metastázovaniu, čo zohráva úlohu pri patogenéze v rade solídnych nádorov, vrátane karcinómu pľúc. K zvýšenej expresii EGFR dochádza tiež u karcinómu pažeráka, hlavy alebo krku (Grandis *et al.*, 1996). Patologická aktivácia býva spôsobená zvýšenou koncentráciou rastových faktorov (ligandov), zvýšením syntézy receptorov (zvýšenie expresie), zmnožením génu pre daný receptor (amplifikácia) a mutáciami týchto génov. U nemalobunkového karcinómu býva v závislosti na histologickom type identifikovaná nadmerná expresia až v 40-80 % prípadov.

3.4.1 Receptorová signalizácia

Naviazaním príslušného ligandu na väzbové miesto v extracelulárnej doméne EGFR receptora dochádza buď k homodimerizácii, alebo heterodimerizácii s receptorom

z ErbB/HER rodiny, najčastejšie je ním HER2. Práve možnosť kombinácie receptorov pri dimerizácii a vyšší počet aktivačných ligandov sú dôvodom signálnej diverzity u EGFR. Dôsledkom tejto diverzity je fakt, že signálna dráha spustená u pacientov s rovnakým ochorením býva aktivovaná na rôznych úrovniach, čo vysvetľuje rôznu účinnosť pri podaní cielenej liečby blokujúcej určitý úsek signálnej dráhy.

Potom ako dôjde k extracelulárnej aktivácii a dimerizácii nasleduje autofosforylácia, prípadne transfosforylácia proteínu sprostredkovaná tyrozínovými zvyškami v intracelulárnej doméne, fosforylácia ďalej zasahuje prenosovú kaskádu vo vnútri bunky prostredníctvom rôznych efektorových proteínov a aktivuje signálne dráhy podieľajúce sa na transformácii nádorových buniek. Medzi hlavné dráhy spustené v týchto bunkách patria KRAS/BRAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, STAT a PLC- γ signálne dráhy.



Obrázok č. 3: Bunková signalizácia po väzbe ligandu na receptor EGFR. Zdroj: Prevzaté a spracované podľa Okines *et al.*, 2011.

3.4.2 Mutácie génu EGFR

Mutácie EGFR u pacientov s karcinómom pľúc predstavujú dominantné apikálne mutácie, ktoré sú zodpovedné za proces karcinogenézy. Možno ich detegovať približne u 10 % nemalobunkových karcinómov pľúc (Foretová *et al.*, 2014). K aktivácii a propagácii aberantného signálu, ktorý vedie k spusteniu anti-apoptotických signálnych dráh a k zvýšenému prežívaniu buniek dochádza napriek neprítomnosti ligandu. Preto sú tieto mutácie označované ako ligand-independentné aktivačné mutácie. Potreba analýz alternácií EGFR súvisí s potvrdením vzťahu medzi prítomnosťou mutácií, alebo zvýšením kópií génu EGFR a citlivosťou na tyrozínkinázové inhibítory (TKI). Častejšie sú mutácie EGFR identifikované u Ázijcov, prevažne žien, nefajčiarov a z histologického hľadiska v prípade adenokarcinómov.

K aktivačným mutáciám dochádza v oblastiach odpovedajúcim exómom 18-24, ktoré kódujú časť kinázovej domény, pričom väčšina je prítomná v exónoch 19 a 21. Tieto mutácie sú rozdelené na tri triedy. Prvá trieda zahŕňa *in-frame* delécie (bez posunu čítacieho rámca) v exóne 19, s frekvenciou výskytu 44 % u EGFR pozitívnych pacientov. Druhou triedou sú bodové mutácie spôsobujúce zámenu aminokyselín, z nich najčastejšia je L858R v exóne 21 s frekvenciou 41 % EGFR mutácií, keď je na kodóne 858 arginín nahradený leucínom. Tretiu triedu predstavujú *in-frame* duplikácie a delécie v exóne 20, ktoré tvoria 5 % EGFR mutácií. Vo väčšine prípadov možno detegovať sekundárnu mutáciu génu EGFR, bodová mutácie T790M v exóne 20, pri ktorej na kodóne 790 dochádza k zámene treonínu za metionín. Mutácia T790M je spájaná s relapsom (návrat ochorenia do predchádzajúceho horšieho stavu) a progresiou ochorenia u pacientov liečených tyrozínkinázovými inhibítormi.

3.4.3 Cílená liečba a EGFR inhibítory

Za účelom vyradiť mutáciami aktivované receptory s tyrozínkinázovou aktivitou (RTK) sa vyvinuli dva terapeutické postupy, ktoré zahŕňajú použitie buď monoklonálnych protilátok zacielených na receptorovú extracelulárnu doménu, alebo nízkomolekulárnych tyrozínkinázových inhibítorov, ktoré sa viažu na aktívne miesto receptora v intracelulárnej doméne a tým ho blokujú.

Tyrozínkinázové inhibítory (TKI) sú malé molekuly štruktúrne analogické k adenosíntrifosfátu (ATP). Inhibítory sa viažu na väzbové miesto pre ATP v katalytickej

kinázovej doméne, touto kompetitívnou inhibíciou bránia autofostorylácii a aktivácii *downstream* signálnych dráh. Prvou generáciou klinicky aplikovaných inhibítorov proti rodine ErbB/HER sú prípravky erlotonib (Tarceva) a gefitinib (Iressa).

Medzi monoklonálne protilátky inhibujúce receptory EGFR patria napríklad cetuximab, panitumumab alebo transtuzumab. Dôležitou súčasťou signálnej dráhy pre EGFR je KRAS, pretože umožňuje prenos signálu od aktivovaného receptora do jadra. Rôzne podnety aj z EGFR môžu spôsobiť aktiváciu onkogénnu KRAS. Mutácie niektorých aktívnych častí (12, 13 kodón) génu KRAS spôsobujú jeho konštitutívnu aktiváciu nezávislú od EGFR. Preto je určenie statusu KRAS génu v klinickej praxi podmienkou pre indikáciu liečby cetuximabom a panitumumabom. Len pacienti s nemutovaným KRAS majú profit z podanej liečby (Rečková *et al.*, 2014).

3.5 ALK (kináza anaplastického lymfómu)

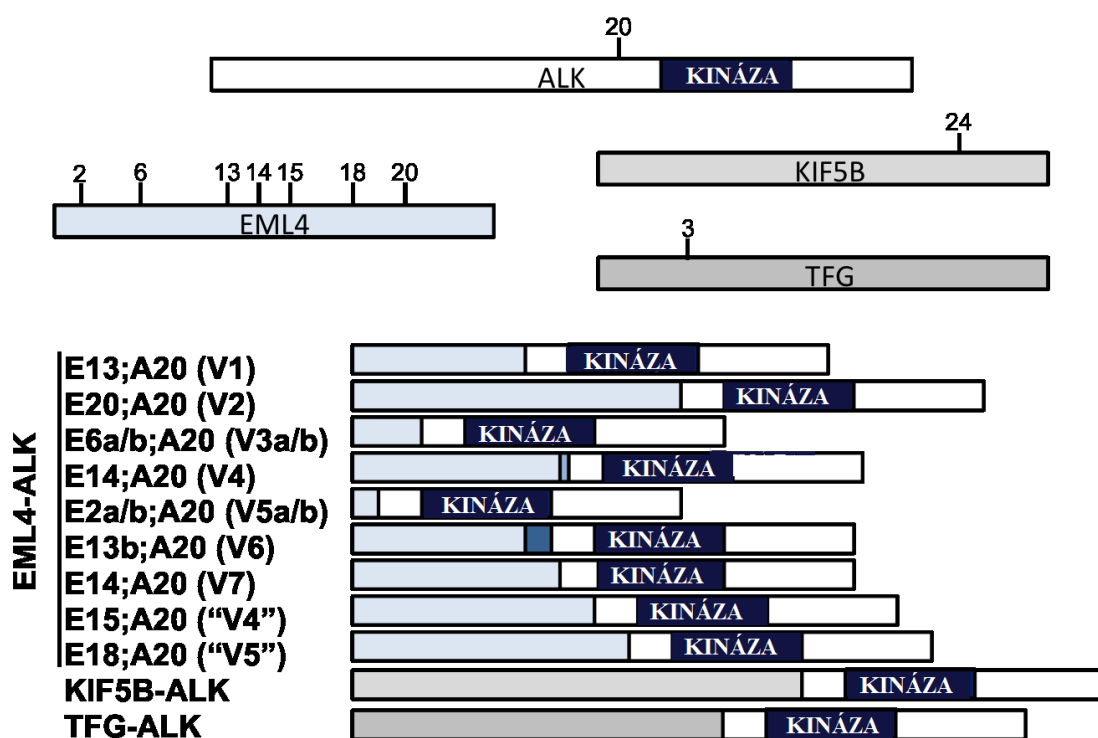
Gén ALK (anaplastic lymphoma kinase) leží na chromozóme 2 v oblasti 2p23 a kóduje transmembránový proteín s tyrozínkinázovou aktivitou. Vďaka sekvenčnej podobnosti sa radí do inzulínovej podrodiny tyrozínkinázových receptorov. Relatívna molekulová hmotnosť nezloženého ALK proteínu je 176 kDa. Pre vykonávanie správnej fyziologickej funkcie musí dôjsť ku glykozylácii extracelulárnej domény, čím narastá relatívna molekulová hmotnosť proteínu na približne 220 kDa. Za fyziologických podmienok je gén ALK exprimovaný v tenkom čreve, semenníkoch a nervovom systéme, kde udržiava rovnováhu medzi proliferáciou, diferenciáciou a prežívaním neurálnych progenitorov počas embryonálneho vývinu. ALK je považovaný za orfanový receptor (nie je presne známa väzbová a funkčná úloha) aj keď je známe, že sekretované rastové faktory PTN (pleiotrophin) a MDK (midkine) po väzbe na extracelulárnu doménu aktivujú *downstream* signálne dráhy.

Aberantná aktivácia receptora ALK sa podieľa na procese onkogenézy viacerých epiteliálnych malignít a jeho amplifikácia a aktivujúce mutácie boli preukázané aj u pacientov s neuroblastómom. Prvýkrát bola chromozómová prestavba ALK génu zistená u anaplastického veľkobunkového lymfómu (ALCL), kde bol identifikovaný ako fúzny partner génu pre nukleofosmín (NPM1), ktorý je lokalizovaný v chromozómovej oblasti 5q35 (Morris *et al.*, 1994).

3.5.1 Chromozómová prestavba génu ALK u nemalobunkového karcinómu pľúc

Prevažujúcimi aberáciami génu ALK v rámci nádorových ochorení sú chromozómové prestavby, výsledkom ktorých je vznik nových fúznych génov. Fúzie vznikajú po translokácii a spojení 3'-konca časti génu ALK odvodenej z chromozómu 2, ktorá kóduje katalytickú kinázovú doménu s 5'-koncom partnerského génu, ktorý nesie promotorovú oblasť. ALK receptor je v normálnych tkanivách aktivovaný väzbou ligandu, následnou dimerizáciou a autofosforyláciou kinázovej domény, ale fúzia s 5'-koncom partnerského génu umožňuje obísť tento spôsob aktivácie a zvyšuje onkogénny potenciál ALK génu. V roku 2007 bola opísaná fúzia génu ALK s génom EML4 (echinoderm microtubule associated protein like 4) u 6,7 % (5/75) pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc z Japonska (Soda *et al.*, 2007). EML4 gén leží na krátkom ramienku chromozómu 2 v oblasti 2p21 a kóduje proteín dôležitý pre správne usporiadanie mikrotubulov

v cytoplazme bunky. Keďže sú oba gény lokalizované na chromozóme 2, avšak v opačnej orientácii so vzdialenosťou 12 megabáz (Mb) je vznik fúzie výsledkom malej paracentrickej inverzie (2p21-p23). Frekvencia zastúpenie tvorí približne 3 – 7 % pacientov s karcinómom pľúc. Z klinicko-patologického hľadiska sa translokácie EML4/ALK vyskytujú u mladších pacientov, nefajčiarov a všetkých podtypov adenokarcinómu, hlavne u solídneho karcinómu s prstencovitými bunkami a mucinózneho kribriiformného adenokarcinómu (Rodig *et al.*, 2009). V súčasnosti je známych niekoľko možných variant fúzií, ktoré vždy zahŕňajú exóny 20-29 génu ALK a osem rôznych exónov génu EML4. Vzácnnejšie dochádza u pacientov s nemalobunkovým karcinómom k fúzii ALK s génmi TFG (transforming growth factor), KIF5B (kinesin family member 5B) alebo KLC1 (kinesin light chain 1) (Takeuchi *et al.*, 2009; Togashi *et al.*, 2012).



Obrázok č. 4: Možné varianty prestavieb génu ALK s fúznymi partnermi. Nomenklatúra jednotlivých variant pozostáva zo začiatočného písmena názvu génu, jednotlivé čísla uvedené za týmito písmenami odpovedajú príslušným exónom v mieste zlomu. Zdroj: Prevzaté a prepracované podľa Lovly *et al.*, 2014; dostupné na www.mycancergenom.org.

3.5.2 ALK inhibítory

Vo väčšine prípadov nebývajú prestavby génu ALK asociované so žiadnou inou onkogénnou mutáciou typickou pre karcinóm pľúc (mutácia génu EGFR a génovej rodiny RAS), čím nadobúdajú význam ako vhodné terapeutické ciele. Zároveň bývajú tieto prestavby u pacientov spojené s rezistenciou voči EGFR inhibítorom.

Crizotinib (PF-02341066, Pfizer) je selektívny multikinázový nízkomolekulárny inhibítor receptora ALK a jeho onkogénnych variant c-MET/HGFR (hepatocyte growth factor receptor) a ROS1 (repressor of silencing 1). Väzbou inhibítora do ATP väzbového miesta kinázovej domény je účinne inhibovaná fosforylácia a aktivácia ALK už v nanomolárnej koncentrácii, čo spôsobuje selektívnu inhibíciu rastu buniek a indukuje u nich apoptózu. Avšak aj pri liečbe crizotinibom u niektorých pacientov dochádza k rezistencii, ktorá je dôsledkom viacerých sekundárnych mutácií ALK génu. U väčšiny z nich ide o substitučné bodové mutácie vedúce k zámene aminokyselín v polypeptidovom reťazci kinázovej domény (F1174L, F1174C, L1196M, I1171T, G1202R, S1206Y, G1269S, G1269A), alebo k amplifikácii génu ALK (Choi *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2010; Heuckmann *et al.*, 2011; Doebele *et al.*, 2012; Katayama *et al.*, 2012).

Okrem crizotinibu boli Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) schválené preparáty ceritinib a nedávno aj alectinib na liečbu ALK-pozitívnych pacientov s metastázujúcim NSCLC. V predklinickom testovaní vykazoval alectinib schopnosť blokovať *gatekeeper* mutáciu L1196M, ktorá je zodpovedná za rezistenciu voči crizotinibu u ALK-pozitívnych bunkových línií (Sakamoto *et al.*, 2011).

V súasných štúdiách sa efektívne javia aj farmakologické stratégie, ktoré sa snažia blokovať gén ALK nepriamo. Jednou z nich je inhibícia chaperonového proteínu HSP90 (heat shock protein 90), ktorý stabilizuje radu proteínov, vrátane ALK. V predklinickom testovaní bola inhibícia HSP90 účinná u ALK-pozitívnych prípadov rezistentných voči crizotinibu a tiež na rezistentných modeloch rakoviny pľúc so sekundárnymi mutáciami (Sang *et al.*, 2013).

3.6 ROS1 (repressor utlmenia génovej expresie)

Intenzívne prebiehajúce štúdie postupne odhaľujú nové mutácie vedúce ku konštitutívnej aktivite určitých receptorov s kinázovou aktivitou, podľa ktorých možno definovať špecifickú podskupinu pľúcneho karcinómu. S frekvenciou približne 2 % prípadov sa v rámci skupiny adenokarcinómu vyskytuje chromozómová prestavba génu ROS1 (repressor of silencing 1) (Bergethon *et al.*, 2012). ROS1 je gén lokalizovaný na chromozóme 6 v oblasti 6q22, ktorý obsahuje 44 exónov a kóduje receptorovú tyrozínkinázu z inzulínovej podrodiny tyrozínkinázových receptorov. Proteín, ktorý tento gén kóduje má relatívnu molekulovú hmotnosť 259 kDa a skladá sa z veľkej N-terminálnej extracelulárnej domény, hydrofóbnej transmembránovej oblasti a C-terminálnej intracelulárnej časti s kinázovou doménou.

Chromozómové prestavby génu ROS1 boli objavené v nádorovej línii U118MG ľudského glioblastómu, u ktorej došlo intrachromozómovou deléciou chromozómu 6 na 5'-konci, kde je lokalizovaný gén FIG (fused in glioblastoma) k spojeniu s 3'-koncom génu ROS1. Fúzny gén FIG/ROS1 bol indentifikovaný v 8,7 % prípadov cholangiokarcinómu a taktiež sa jeho expresia preukázala u rakovinou vaječníkov (Gu *et al.*, 2010; Birch *et al.*, 2011). Presná funkcia ROS1 kinázy v zdravých tkanivách nie je úplne známa a je zatiaľ považovaná za jeden z orfánových receptorov, u ktorých ešte nebol identifikovaný ligand.

3.6.1 Prestavby ROS1 a cielená liečba

Objavenie prestavieb v géne ROS1 bolo v prípade pľúcneho adenokarcinómu spojené s nižším vekom pacientov a častejší výskyt bol identifikovaný u nefajčiarov (Takeuchi *et al.*, 2012). Reverzná transkripcia s následnou amplifikáciou pomocou PCR (RT-PCR), imunohistochemické vyšetrenie (IHC) a fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) sú využívané k detekciám onkogénnych chromozómových prestavieb. Umožnili identifikáciu rady fúznych partnerov génu ROS1 zahrňujúcich TPM3 (tropomyosin 3), CD74, SDC4 (syndecan 4), SLC34A2 či EZR (erzin) (Davies *et al.*, 2012; Takeuchi *et al.*, 2012).

Fúzny gén ROS1/CD74 (invariabilný reťazec HLA-antigénov triedy II) tvorí asi 30 % všetkých ROS1 prestavieb (Jun *et al.*, 2012). Translokácia t(5;6)(q32;q22) vedie k vzniku proteínu s dvomi transmembránovými doménami. CD74 je transmembránový glykoproteín asociovaný s hlavným histokompatibilným komplexom druhej triedy (MHC II) a po väzbe ligandu, ktorým je inhibičný faktor migrácie makrofágov (MIF), dochádza k zvýšenej

regulácii protizápalových cytokínov.

Na základe preukázania homológie aminokyselinových sekvencií v kinázovej doméne receptora ROS1 a receptora ALK sa predpokladalo, že nádory s ROS1 fúznymi génmi by mohli byť senzitívne voči ALK inhibítorom. Tento predpoklad potvrdila štúdia z roku 2011, ktorá bola zameraná na predklinické testovanie crizotinibu u pacienta s pokročilým štádiom ROS1-pozitívneho adenokarcinómu. Pacientom bol 31-ročný nefajčiar, ktorému bol v roku 2010 diagnostikovaný multifokálny bronchoalveolárny karcinóm. Zároveň sa u neho genetickým testovaním nepreukázala EGFR mutácia ani ALK prestavba. Po týždni liečby crizotinibom s dávkou 250 mg dvakrát denne bolo u pacienta pozorované zlepšenie stavu a zmiernenie hypoxie. Po dvanástich týždňoch liečby bolo u pacienta potvrdené úplné vymiznutie nádoru a aj po niekoľkých mesiacoch terapie neboli u neho pozorované známky recidívy (Bergethon *et al.*, 2012).

Od roku 2016 je spoločnosťou FDA crizotinib schválené terapeutikum pre liečbu pacientov s ROS1-pozitívnym adenokarcinómom.

3.7 RET (prestavený počas transfekcie)

Chromozómové prestavby génu RET (rearranged during transfection) u nemalobunkového karcinómu pľúc boli prvýkrát popísané v roku 2011 na základe sekvenovacích techník (Ju, 2012). Prestavby boli zistené v nádoroch, ktoré neniesli žiadnu známu onkogénnu mutáciu (mutácia génu EGFR, ALK, rodiny RAS), tým sa stali novými *driver* (významnými) mutáciami identifikovanými u NSCLC. Výskyt RET mutácií je u NSCLC zaznamenaný asi v 1 % prípadov (Kohno *et al.*, 2012). Typickými alternáciami génu RET sú fúzie, ktoré vedú k tvorbe chimérických proteínov indukujúcich spontánnu proliferáciu, diferenciáciu a prežívanie buniek.

Protoonkogén RET je lokalizovaný na chromozóme 10, v oblasti 10q11.2 a kóduje receptorovú tyrozínkinázu s extracelulárnou, transmembránovou a intracelulárnou kinázovou doménou. Extracelulárna ligand-väzbová doména obsahuje štyri cadherin-like domény a vysoko konzervatívnu oblasť bohatú na cysteín, ktorá je dôležitá pri udržaní terciárnej štruktúry proteínu a dimerizácii vytváraním disulfidových väzieb. Ligandy aktivujúce receptor RET patria do rodiny neurotrofických faktorov (GDNF), ktoré regulujú neurogenézu, prežívanie, diferenciáciu nervových buniek a podieľajú sa na odpovedi nervového systému na zápal a poškodenie. Medzi spomenuté faktory patria GDNF, neurturín (NRTN), artemín (ARTN) a persefín (PSPN). Aktivácia receptora RET vedie k spusteniu bunkovej signalizácie, ktorá zahŕňa RAS/RAF/ERK, PI3K/AKT a JNK signálne dráhy (Phay *et Shah*, 2010). Prestavby RET génu boli po prvýkrát identifikované u pacientov s papilárnym karcinómom štítnej žľazy (PTC). Fúznym partnerom génu RET je v 70-90 % gén KIF5B a v 10-25 % gén CCDC6. S menšou frekvenciou sa vyskytujú fúzie s génmi NCOA4, TRIM33, ERCC1, HTR4 alebo CLIP1.

3.7.1 KIF5B/RET fúzny gén

Najčastejšou génovou fúziou u pacientov s NSCLC je KIF5B (kinesin family member 5B gene)/RET, keďže oba gény ležia na chromozóme 10 vo vzdialenosti 10 megabáz (Mb) k prestavbe dochádza pericentrickou inverziou (10p11.22-q11.21). Prestavby RET génu sú charakteristické pre pacientov s nižším vekom (≤ 60 rokov), nefajčiarov, pre prípady so skorým metastázovaním do lymfatických uzlín a v solídnych podtypoch adenokarcinómu (Wang *et al.*, 2012). Analýzou genómu nádorov pozitívnych na RET fúzie metódou PCR bolo preukázané, že k somatickým fúziám dochádza medzi intrónmi 15, 16, 23 a 24 génu

KIF5B a intrónmi 7 alebo 11 génu RET (Kohno *et al.*, 2012).

Na cielenú liečbu NSCLC pacientov s prestavbami RET génu nebol do klinickej praxe dosiaľ zavedený žiaden selektívny RET inhibítor, ale je známych niekoľko komerčne dostupných multikinázových inhibítorov, ktoré dokážu blokovať aberantnú aktivitu RET kinázy. Vandetanib (ZD6474) je multikinázový inhibítor (TKI) blokujúci RET, VEGFR2/KDR, VEGFR3/FLT4 a vo vyšších koncentráciách aj EGFR. V roku 2012 bol vandetanib uznaný spoločnosťou FDA ako cielený preparát v liečbe pacientov s medulárnym karcinómom štítnej žľazy. Výsledok nedávnej štúdie preukázal, že zavedenie vandetanibu by mohlo byť efektívne a viesť k pozitívnejším prognózam aj u pacientov s NSCLC. V tejto štúdií bolo u 36 ročnej pacientky, nefajčiarky s metastázujúcou rakovinou pľúc (CCDC6/RET pozitívna) pozorované po 6 týždňoch podávania vandetanibu značné zmenšenie nádoru v hrudnej oblasti (*fossa supraclavicularis*) a po 11 týždňoch až 76 % redukcia a zároveň niekoľko menších metastáz z pľúc úplne zmizlo (Falchook *et al.*, 2016). V súčasnosti prebieha niekoľko klinických štúdií, ktoré skúmajú potenciálnu účinnosť RTK inhibítorov cabozantinibu (XL-184) v klinickom testovaní NCT01639508, ponatinibu v testovaní NCT01813734 a sunitinibu v testovaní NCT01829217 (Shtivelman *et al.*, 2014, Kohno *et al.* 2016).

3.8 NTRK1

NTRK1 (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1) je receptorová tyrozínkináza označovaná aj TrkA, alebo TRK, ktorá patrí do TRK (tropomyosin-related kinases) rodiny receptorov (RTK) spolu s TrkB (kódovaná NTRK2) a TrkC (kódovaná NTRK3) tyrozínkinázami (Nakagawara 2001; Sossin 2006). Gén NTRK1 je lokalizovaný na chromozóme 1, v oblasti 1q21-22, a kóduje vysoko afinitný TrkA (nerve growth factor receptor) receptor. Za fyziologických podmienok je TrkA aktivovaná väzbou ligandu NGF s následnou dimerizáciou, ktorá zahŕňa autofosforyláciu špecifických tyrozínových zvyškov v intracelulárnej doméne a transfosforyláciu série substrátov. To vedie k aktivácii PI3K/AKT, RAS/MAPK a PLC- γ signálnych dráh riadiacich kontrolu bunkového rastu a diferenciácie. Pri chromozómových aberáciách dochádza k prestavbám génu NTRK1, ktoré vznikajú fúziou jeho 3'-konca s 5'-koncom rôznych aktivačných génov. Vzniknuté fúzne gény kódujú chimérické proteíny, ktoré obsahujú tyrozínkinázovú doménu pochádzajúcu z génu NTRK1 a N-terminálnu doménu fúzneho partnera, ktorá nesie coiled-coil doménu. V roku 1986 bola prvýkrát identifikovaná prestavba génu NTRK1 u kolorektálneho karcinómu, pri ktorej bol preukázaný vznik fúzneho génu NTRK1/TPM3 (tropomyosin 3) somatickou intrachromozómovou prestavbou (Martin-Zanca *et al.*, 1986).

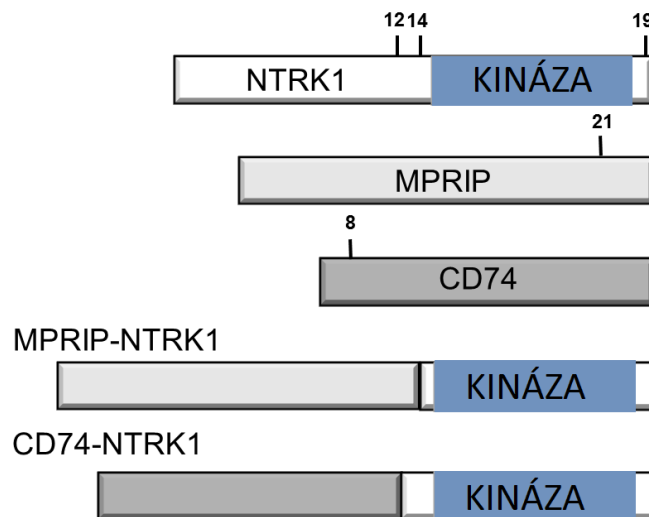
3.8.1 Prestavby génu NTRK1 identifikované u NSCLC

Prestavba génu NTRK1 bola u NSCLC detegovaná v rámci analýzy skupiny 91 pacientov s adenokarcinómom. Výsledkom štúdie bolo zistenie, že k fúziám NTRK1 dochádza približne v 3,3 % prípadov NSCLC, u ktorých nebola zistená iná onkogénna *driver* mutácia. Metódou sekvencovania novej generácie (NGS, next-generation sequencing) boli identifikované dva rôzne fúzne gény MPRIP/NTRK1 a CD74/NTRK1 (Vaishnavi *et al.*, 2013).

V klinickej praxi sa prítomnosť NTRK1 fúzií zisťuje najčastejšie pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie s použitím prôb, ktoré sa označujú NTRK1 *break-apart* próby. Týmto spôsobom detekcie je možné potvrdiť, alebo vyvrátiť podozrenie sa génovú prestavbu NTRK1, avšak neumožňuje preukázať fúzneho partnera v danej vzorke.

Testovanie terapeutických preparátov, ktoré by sa potenciálne mohli uplatniť v cielej liečbe NTRK1 mutácií je zatiaľ v štádiu predklinického testovania. Potenciálne uplatnenie by mohli mať TrkA inhibítory ARRY-470, CEP-701, ale aj crizotinib, ktoré v testovaní

účinne inhibovali určité signálne dráhy a tým blokovali expresiu fúzných proteínov v nádorových bunkových líniah (Vaishnavi *et al.*, 2013).



Obrázok č. 5: Varianty fúzií génu NTRK1 identifikované u pľúcnych karcinómov. Zdroj: Prevzaté a prepracované podľa Lovly *et al.*, 2014; dostupné na www.mycancer genom.org.

4. Experimentálna časť

Experimentálna časť bakalárskej práce bola zameraná na analýzu a hodnotenie numerických a štruktúrnych zmien chromozómov nesúcich gény EGFR, ALK, ROS1, RET a NTRK1 u pacientov s NSCLC pomocou metódy fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH). Vyšetreniu aberácie génu EGFR predchádzala príprava dostatočne senzitívnej a špecifickej fluorescenčne značenej DNA próby CEP7/EGFR, použiteľnej pre diagnostiku. Zvyšné gény boli vyšetrené použitím komerčne dostupných fluorescenčne značených DNA prób.

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Príprava fluorescenčne značenej DNA próby

Hlavnou súčasťou vyšetrenia chromozómových aberácií FISH metódou je príprava fluorescenčne značených DNA prób, komplementárnych k cieľovému segmentu vyšetrovanej DNA. Na prípravu kombinovanej próby pre gén EGFR s CEP7 (centromérová próba pre chromozóm 7) bola izolovaná plazmidová DNA, obsahujúca DNA sekvencie génu EGFR a CEP7. K tomuto účelu bol použitý klon PR11-339F13 so sekvenciou EGFR a bakteriálny klon PZ75 so sekvenciou CEP7.

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH)

V rámci experimentálnej časti bakalárskej práce bolo analyzovaných 40 náhodne vybraných pacientov s rôznym štádiom a histologickým subtypom NSCLC. Vyšetrenie bolo prevedené na tkanivových rezoch fixovaných formalínom a zaliatych parafrínom (FFPE) na podložných sklíčkach, poskytnutých z patologické oddelia Nemocnice Olomouc.

4.1.2 Chemikálie

Cytocell:

DAPI

<u>Fagron:</u>	etanol (96%)
<u>Invitrogen:</u>	LB Broth Base
<u>mikroChem:</u>	isopropylalkohol, xylén
<u>Lach-Ner:</u>	chlorid draselný (KCl), hydrogénfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)
<u>Sigma Aldrich:</u>	chlorid sodný (NaCl), chloramphenicol, pepsín (pepsin from porcine gastric mucosa), tiokyanát sodný (NaSCN)
<u>Olympus:</u>	imerzný olej IMMOIL-F30CC

4.1.3 Roztoky a média

- LB médium

20 g	LB Broth Base
4,17 g	NaCl
12,5 g	chloramphenicol

Navážky rozpustiť v 1 l deionizovanej vody.

- TE tlmivý roztok

200 µl	0,5 mol/l Tris
200 µl	0,05 mol/l EDTA

Doplniť do objemu 10 ml deionizovanou vodou.

- Roztok P1, P2, P2, QBT, QC tlmivý roztok, QF tlmivý roztok

Súčasťi diagnostickej súpravy QIAGEN Plasmid Mega Kit (25).

- Zásobný 20x koncentrovaný SSC

175 g	NaCl
88 g	citrát sodný dihydrát

Doplniť deionizovanou vodou do objemu 1 l, upraviť pH na hodnotu 5,3.

- Zásobný 10x koncentrovaný PBS

80 g	NaCl
2 g	KCl
32,1 g	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O

Doplniť deionizovanou vodou do objemu 1 l.

- Oplachovací pufer (Wash Buffer; 2x koncentrovaný SSC; pH 7,0)

100 ml	20x koncentrovaný SSC
--------	-----------------------

Zriediť s 900 ml deionizovanej vody, upraviť pH na hodnotu 7,0.

- Roztok na ošetrovanie preparátu pred hybridizáciou (Pretreatment Solution)

1 M	tiokyanát sodný (NaSCN)
-----	-------------------------

Pred použitím nutné vyhriať na 80° C.

- Pufer pre proteázu (NaCl; pH 2,0)

Upraviť fyziologický roztok pomocou HCl na pH 2,0. Pred použitím overiť hodnotu pH.

- Proteáza

25 – 50 g	pepsín
50 ml	pufer pre proteázu (NaCl; pH 2,0); 37° C

Rozpustenie pepsínu v roztoku bezprostredne pred použitím.

- 10% formalín (4% pufrovaný formaldehyd)

10 ml	10x koncentrovaný PBS
4 ml	formaldehyd 36-38%
86 ml	dH ₂ O

- Premývací roztok I (0,4x koncentrovaný SSC / 0,3% NP-40)

20 ml	20x SSC
3 ml	NP-40 (neionogénny detergent)

Doplniť deionizovanou vodou do objemu 1 l, upraviť pH na hodnotu 7,0-7,5. Pred použitím nutné vyhriať na 58° C.

- Premývací roztok II (2x koncentrovaný SSC / 0,1% NP-40)

100 ml	20x SSC
1 ml	NP-40

Doplniť deionizovanou vodou do objemu 1 l, upraviť pH na hodnotu 7,0 ± 0,2° C.

- 0,2 M HCl

17 ml	HCl 35%
-------	---------

Doplniť deionizovanou vodou do objemu 1 l.

4.1.4 Laboratórne prístroje, pomôcky a diagnostické súpravy

- Laboratórne prístroje

analytické váhy ED423S-0CE, Sartorius Stedim Biotech (Nemecko); magnetické miešadlo s ohrevom AREC.X, VELP Scientifica (Taliansko); chladená centrifúga Rotina 420R, Hettich (Nemecko); chladnička s mraziakom LCv 4010 MediLine, Liebherr (Nemecko); stolná minicentrifúga MiniSpin® plus, Eppendorf (Nemecko); elektrické miešadlo Lab Dancer, Ika (Nemecko); výrobňík ľadu; homogenizátor Bioruptor® Standard, Diagenode (Belgicko); vákuový koncentrátor Concentrator 5301, Eppendorf (Nemecko); vodný kúpeľ

Eco Temp TW8, Julabo (Nemecko) s priehľadným vekom Macrolon; laminárny box Herasafe™ KS 12 Biohazard, Thermo Scientific (Nemecko); pH meter Hanna pH 211, Sigma Aldrich (USA); fluorescenčný mikroskop BX51TF, Olympus (Japonsko) s príslušnými filtermi; inkubátor INE400, Memmert (Nemecko); hybridizér HYBrite, Vysis (USA), vyhrevná platňa StatSpin® ThermoBrite, Leica Biosystems (USA)

- Laboratórne sklo a pomôcky

centrifugačné fľaše s uzáverom (500 ml); centrifugačné skúmavky typ Falcon (50, 100 ml); odmerný valec (100 ml, 1000 ml); jednorazové Pasteurové pipety; prečisťovacie kolóny s plastovým stojanom (súčasť QIAGEN Plasmid Mega Kitu); automatické mikropipety Pipetman s rôznym rozsahom, Gilson (Francúzsko); sterilné špičky na mikropipety; sklenené nádoby na farbenie roztokov typ Coplin (50 ml); stopky Intimex; ochranné rukavice; sterilná pinzeta; buničitá vata; filtračný papier; nasiakavá podložka; krycie sklíčka; špeciálny cementový lep Fixogum

- Súprava na izoláciu plazmidovej DNA

QIAGEN Plasmid Mega Kit (25) (Nemecko)

- Komerčné zmesi hybridizačných DNA prób:

KIF5B-RET Fusion/Translocation FISH Probe Kit, CytoTest Inc. (USA), REF. CT-PAC076-10-06; NTRK1 Break Apart FISH Probe Kit, CytoTest Inc. (USA), REF. CT-PAC143-10-06; ALK (2p230) Break, Leica Biosystems (USA), REF.pKBI-10747; ROS1 (6q22), Break, Leica Biosystems (USA), REF.pKBI-10752

4.2 Metodika

Príprava fluorescenčne značenej DNA próby

4.2.1 Kultivácia bakteriálnej kultúry

Navážených 20 g komerčne dostupného LB média a 4,17 g soli NaCl bolo prenesených do sterilnej Erlenmayerovej banky (1000 ml), a rozpustených v 1000 ml deionizovanej vody. Do pripravovaného tekutého média bolo pridaných 12,5 mg chloramphenicolu. Hotové kultivačné LB médium bolo vysterilizované v autokláve a následne bol naočkované príslušným bakteriálnym kmeňom. Kultivácia bakteriálnych kultúr prebehla v inkubátore na orbitálnej trepačke pri 220 otáčkach za minútu a teplote 37° C počas noci.

4.2.2 Izolácia plazmidovej DNA QIAGEN Plasmid Mega Kitom

Po kultivácii bola bakteriálna kultúra preliata do centrifugačných fliaš (500 ml) a scentrifugovaná pri 6000 g a teplote 4° C po dobu 15 min. Po centrifugácii bol z fliaš do odpadu zliaty supernatant a k sedimentu na dne bolo priliatych spolu 50 ml roztoku P1, v ktorom bol sediment resuspendovaný a zhomogenizovaný pretrepávaním. K bakteriálnej suspenzii bolo pridaných 50 ml roztoku P2, opatrným prevrátením fliaš bol obsah premiešavaný pokiaľ sa suspenzia nesfarbila do modra. Následne sa po dobu 5 min pri laboratórnej teplote nechala suspenzia odstáť. V ďalšom kroku bolo pridaných 50 ml roztoku P3 a opatrným obrátením sa nechali zo suspenzie vyzrážať balastné zložky. Vyzrážaná suspenzia sa nechala stáť pri laboratórnej teplote po dobu 30 min a následne sa preliala do centrifugačných skúmaviek (50 ml), ktoré sa scentrifugovali pri 20000 g a teplote 4° C po dobu 30 min. Centrifugácia supernatantu bola opakovaná pokiaľ nebol čirý. Na odmerný valec (1000 ml) bola umiestnená premývací kolóna, na ktorú bolo nanesených 35 ml roztoku QBT, ktorý sa nechal kolónou pretiecť. Na preliatu kolónu bol nanesený scentrifugovaný supernatant, ktorý sa nechal voľne pretiecť. Premývací kolóna bola preliata 200 ml QC pufrom, obsah valca bol následne vyliaty do odpadu. Premývací kolóna bola umiestnená na nový odmerný valec (100 ml) a plazmidová DNA z nej bola eluovaná premytím s 35 ml QF pufru. Eluát bol po pridaní 24,5 ml isopropylalkoholu preliaty do centrifugačných skúmaviek (50 ml) a scentrifugovaný pri 15000g a teplote 4°C po dobu 30 min. Supernatant bol opatrne vyliaty a k sedimentu bolo pridaných 7 ml 70% etanolu. Nasledovala centrifugácia pri 15000 g a teplote 4° C po dobu 10 min. Supernatant

bol vyliaty do odpadu a peleta na dne skúmaviek sa nechala voľne vysychať 10-20 min. Vyschnutá peleta plazmidovej DNA sa rozpustila v TE tlmivom roztoku a bola zmeraná jej koncentrácia. Izolovaná plazmidová DNA sa uchovávala pri -20° C v chladiacom boxe.

4.2.3 Značenie DNA próby pomocou Platinum Bright Nucleic Acid Labeling Kitu

- **Fragmentácia plazmidovej DNA pomocou ultrazvuku**

Pred začiatkom vlastného postupu práce bola v nádobe s ľadom vychladená deionizovaná voda (1000 l). V špeciálnych mikroskúmavkách (0,5 ml) bol nariadený 1 µg plazmidovej DNA do 100 µl deionizovanej vody, mikroskúmavky boli krátko premiešané na elektrickej miešačke a scentrifugované na stolnej centrifúge. Nariadená plazmidová DNA sa nechala vychladiť v nádobe s ľadom po dobu 15 min. Do homogenizátora bolo naliate požadované množstvo vychladenej deionizovanej vody, mikroskúmavky boli uložené do kovového kruhového stojana, utesnené kovovým vekom a naplnený stojan bol opatrne umiestnený do homogenizátora. Fragmentácia plazmidovej DNA bola zahájená spustením programu 20 cyklov sonikácie, každý cyklus po dobu 30 s a 90 s pauzou medzi jednotlivými cyklami. Po sonikácii boli otvorené mikroskúmavky umiestnené do vakuového koncentrátora a ich obsah s naštiepanou plazmidovou DNA v deionizovanej vode sa nechal odpariť na objem 16 µl. Odparovaný objem bol kontrolovaný vždy po 30 min.

- **Kontrola dĺžok fragmentov plazmidovej DNA separáciou v agarózovom géle**

Gél pre elektroforetickú separáciu bol pripravený navážením 0,5 g agarózy a rozpustením v 50 ml deionizovanej vody. Do ešte teplého gélu bolo pridaných 5 µl fluorescenčného farbiva Gel-Red, agarózový gél bol následne preliaty do vaničky v elektroforetickej komôrke, do gélu bol umiestnený hrebienok a nechal sa stuhnúť po dobu 20 min. Po zatuhnutí bol gél preliaty TBE tlmivým roztokom a odstránený hrebienok. Do jednej jamky v géle bolo nanesených 5 µl deionizovanej vody s 2 µl štandardu relatívnej molekulovej hmotnosti (GeneRuler 1 kb DNA Ladder) a do ďalšej jamky 5 µl plazmidovej DNA s 2 µl nanášacieho pufru (6x DNA Loading Day). Po nenesení vzoriek bola elektroforetická komôrka uzavretá vekom s elektródami a pripojená k zdroju

jednosmerného napätia (75 V). Po 60 min bola elektroforetická separácia ukončená, gél bol vytiahnutý z vaničky, opláchnutý deionizovanou vodou a vizualizovaný pod UV-svetlom.

- **Značenie plazmidovej DNA Platinum Bright Nucleic Acid Labeling Kitom**

Všetky reagenty obsiahnuté v Labeling Kite boli pred použitím krátko premiešané na elektrickom miešadle a scentrifugované na stolnej centrifúge. Do mikroskúmaviek so 16 µl nariadenej plazmidovej DNA boli pridané 2 µl fluorescenčného farbiva ULS dye (oranžové/zelené) a 2 µl 10x labeling solution. Obsah mikroskúmaviek bol premiešaný pipetovaním. Mikroskúmavky so značenou plazmidovou DNA boli inkubované vo vodnom kúpeli vyhriatom na 85° C po dobu 30 min. Po inkubácii boli mikroskúmavky prenesené na čas do ľadu.

- **Prečistenie pomocou Platinum Bright Nucleic Acid Labeling Kitu**

Pred začiatkom vlastného postupu práce boli náplne v kolónach na prečistenie resuspendované krátkym premiešaním na elektrickej miešačke. Vrchné škóbovacie uzávery na kolónach boli uvoľnené a spodné uzávery kolón ulomené. Prečisťovacie kolóny boli umiestnené na špeciálne mikroskúmavky a v nich scentrifugované pri 20000 g po dobu 1 min. Obsah pretečený do mikroskúmaviek bol vyliaty do odpadu a prečisťovacie kolóny boli umiestnené späť na mikroskúmavky. Na prečisťovacie kolóny bolo nanesených 300 µl deionizovanej vody, kolóny boli scentrifugované pri 20000 g po dobu 1 min. Mikroskúmavky s pretečenou tekutinou boli vyhodené do odpadu. Prečisťovacie kolóny boli umiestnené na nové mikroskúmavky (1,7 ml). Na kolóny boli nanesené vzorky so značenou plazmidovou DNA, ktoré boli do tohto kroku umiestnené v ľade. Mikroskúmavky s kolónami boli scentrifugované pri 20000 g po dobu 1 min. Prečisťovacie kolóny boli odstránené a pretečený obsah v mikroskúmavkách uchovaný.

- **Zrážanie s Cot-1 DNA**

Do mikroskúmaviek so značenou plazmidovou DNA boli pridané 3 µl 3 mol/l octanu sodného s pH 5, ďalej bolo pripipetovaných 10 µl Cot-1 DNA a 83 µl 100% etanolu.

Obsah mikroskúmaviek bol premiešaný opatrným prevrátením. Mikroskúmavky boli uložené do ľadu pri teplote -80°C po dobu 30 min. Po vychladení boli mikroskúmavky so značenou DNA scentrifugované pri 20000 g a teplote 4°C po dobu 30 min. Supernatant vzniknutý po centrifugácii bol opatrne vyliaty do odpadu a peleta na dne bola voľne vysušená. Peleta plazmidovej DNA bola resuspendovaná v 25 μl hybridizačného tlmivého roztoku a uchovaná v mraziacom boxe.

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH)

4.2.4 Príprava parafrínových rezov (pretreatment) pre FISH

- **Deparafrinizácia tkanivových rezov pripevnených na podložných sklíčkach**

Parafrínové tkanivové rezy pripevnené na pozitívne nabitých podložných sklíčkach boli inkubované pri teplote 56°C počas noci, čím sa dosiahla rovnomerne pevná adhézia tkaniva na sklíčko. Sklíčka s parafrínovými rezmi boli inkubované v xyléne pri laboratórnej teplote po dobu 5 min. Tento krok bol zopakovaný ešte dvakrát. Po poslednej inkubácii boli sklíčka osušené pritlačením hrany na nasiakavú podložku. Následne boli sklíčka inkubované dvakrát v 96% etanole pri laboratórnej teplote vždy po dobu 5 min. Po osušení pritlačením hrany o nasiakavú podložku boli sklíčka prenesené na vyhriatu termoplastňu a sušené 10 min pri teplote 49°C .

- **Predpríprava preparátov (pretreatment)**

Preparáty boli postupne inkubované v niekoľkých roztokoch pri presne stanovených teplotných a časových podmienkach. Sklíčka s parafrínovými rezmi boli najskôr inkubované v 0,2 molárnom roztoku kyseliny chlorovodíkovej po dobu 20 min pri laboratórnej teplote. Po vybratí a osušení o nasiakavú podložku boli preparáty prenesené do nádoby na farbenie roztokov (typ Coplin) s deionizovanou vodou a v nej inkubované 3 min. Preparáty boli v ďalšom kroku inkubované 3 min pri laboratórnej teplote v oplachovacom roztoku (2x SSC; pH 7,0). Nasledovala inkubácia preparátov v roztoku NaSCN vyhriatom na teplotu 80°C , umiestnenom vo vodnom kúpeľi, po dobu 20 min. Po uplynutí boli preparáty vybrané z vodného kúpeľa a ponechané voľne 1 min pri

laboratórnej teplote, aby sa predišlo po náhlej teplotnej zmene poškodeniu tkaniva na sklíčku. V ďalšom kroku boli preparáty inkubované v deionizovanej vode po dobu 1 min a postupne dvakrát po 5 min vždy v čerstvom oplachovacom roztoku (2x SSC; pH 7,0).

- **Natrávenie tkanivových preparátov proteázou**

Po druhej inkubácii v oplachovacom roztoku (2x SSC, pH 7,0) boli sklíčka osušené pritlačením hrany o nasiakavú podložku. Pufer pre proteázu bol v inkubátore vytemperovaný a po dosiahnutí teploty 37° C bolo do 50 ml tohto roztoku pridaných 50 mg pepsínu. V takto pripravenom roztoku boli inkubované preparáty pri teplote 37° C v inkubátore po dobu 70 min. Po inkubácii boli preparáty postupne dvakrát premyté vždy v čerstvom oplachovacom roztoku (2x SSC, pH 7,0) po dobu 5 min. Po premytí sa sklíčka osušili pritlačením hrany o nasiakavú podložku a preniesli na vyhriatu termoplastnu, kde sa sušili 5 min pri teplote 49° C.

- **Fixácia vzoriek**

Do nádoby na farbenie roztokov (typ Coplin) bol pred použitím pripravený čerstvý roztok 10% pufrovaného formalínu o objeme 100 ml. V roztoku 10% pufrovaného formalínu boli preparáty fixované pri laboratórnej teplote po dobu 10 min. Po fixácii nasledovalo postupne dvakrát premytie preparátov zakaždým v čerstvom oplachovacom roztoku po dobu 5 min. Sklíčka boli po druhom premytí opláchnuté v deionizovanej vode a umiestnené na vyhriatu termoplastnu, kde sa sušili pri teplote 49° C po dobu 10 min. Po uplynutí doby sušenia boli preparáty pripravené na naniesenie značených DNA prób a prevedenie metódy FISH.

4.2.5 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH)

- **Denaturácia a hybridizácia**

Na vyčistené krycie sklíčko bolo nanesených podľa veľkosti tkaniva vhodné množstvo roztoku DNA próby v hybridizačnom roztoku, na sklíčko s rozmermi 22x22 mm sa

naneslo najviac 10 μ l a nanesené DNA próby vždy odpovedali príslušným vyšetrovaným oblastiam chromozómov. Krycími sklíčkami s kompetentnou DNA próbou pre analýzu určitej chromozómovej oblasti boli prekryté suché deparafinizované preparáty. Krycie sklíčka boli prelepené špeciálnym tekutým lepom (Fixogum), aby sa zabránilo ich vysušeniu. Zalepené preparáty boli umiestnené do vlhkej komôrky hybridizéra s nastaveným programom pre parafrínové rezy. Po dobu 1 min pri 85° C prebiehala kodenaturácia DNA prób aj vzoriek a potom nasledovala ich vzájomná hybridizácia pri teplote 37° C počas noci.

- **Odmytie nehybridizovanej DNA próby**

Po hybridizácii DNA próby na preparáte boli opatrne sterilnou ihlou odlepené a odstránené krycie sklíčka. Preparáty bez krycích sklíčok boli prenesené do premývacieho roztoku I (0,4x SSC / 0,3% NP-40), vopred vytemperovaného na 73° C. Sklíčka boli spočiatku zľahka opláchnuté a potom inkubované po dobu 1 min a 45 s. Z premývacieho roztoku I boli sklíčka prenesené a inkubované v premývacom roztoku II (2x SSC / 0,1% NP-40), kde sa pri laboratórnej teplote najskôr opatrne opláchli a potom inkubovali 30 s. Jemným pritlačením hrany sklíčok o nasiakavú podložku boli osušené a nechali sa voľne zaschnúť pri laboratórnej teplote bez prístupu svetla po dobu 25-30 min. Pripravené suché preparáty boli prekryté krycími sklíčkami, na ktorých bolo nanesených 10 μ l fluorescenčného farbiva DAPI, vďaka čomu sa zafarbili bunkové jadrá na preparátoch, aby boli pozorovateľné pri hodnotení pod fluorescenčným mikroskopom.

4.2.6 Hodnotenie výsledkov

Hodnotenie pripravených tkanivových preparátov s nahybridizovanou DNA próbou bolo prevedené pomocou fluorescenčného mikroskopu. Z každého tkanivového bloku boli odčítané a hodnotené fluorescenčné signály zo 100 interfáznych bunkových jadier. Hodnotenie odpovedalo písomného záznamu a výpočtu priemerných počtov analyzovaných génov a chromozómových oblastí na bunkové jadro.

5. Výsledky

Súbor 40 pacientov s pľúcnym karcinómom bol podrobený testovaniu na preukázanie prítomnosti mutácií v génoch, ktoré sú považované za hlavné prediktívne biomarkery tohto typu ochorenia. Bola pripravená duálna fluorescenčná DNA próba na detekciu možnej amplifikácie génu EGFR a polyzómie chromozómu 7, na ktorom je gén lokalizovaný. K vyšetreniu možných alternácií génov ALK, ROS1, RET a NTRK1 boli použité komerčne dostupné próby. U každého pacienta bolo prevedené vyšetrenie na všetkých päť génov. Získané výsledky boli následne štatisticky spracované a bola hľadaná korelácia medzi nadobudnutými výsledkami a dostupnými klinicko-patologickými dátami.

Signály pre CEP7/EGFR, ALKgreen/ALKorange, ROS1green/ROS1orange, RET/KIF5B a NTRK1green/NTRK1orange boli štandardne odčítané jednotlivo u každého pacienta zo 100 bunkových jadier. K tomuto účelu boli použité vzorky pľúcneho tkaniva fixované vo formalíne a zaliate parafínom (FFPE), ktoré bolo pred aplikáciou prób nutné opracovať. Pokiaľ bol preparát cytologicky chudobný a nebolo možné odčítať ani 50 jadier, bol označený ako nehodnotiteľný (nehod.).

U všetkých pacientov boli vypočítané priemerné hodnoty jednotlivých génov ako aj centromérickej oblasti chromozómu 7. Pokiaľ bola pozorovaná v určitej vzorke prítomnosť aberácie ktoréhokoľvek z génov bolo zároveň stanovené jej celkové percentuálne zastúpenie. Cut-off hodnota pre ALK, ROS1, RET a NTRK1 pozitivitu bola stanovená na 15 % jadier, v ktorých sa daná prestavba vyskytovala. Za amplifikáciu (navýšenie počtu kópií) génu a polyzómiu centromérickej oblasti chromozómu 7 bol považovaný stav, ak viac ako 30 % (vrátané) jadier vykazovalo vyšší počet než 2 signály odpovedajúceho génu (prípadne centromérickej oblasti).

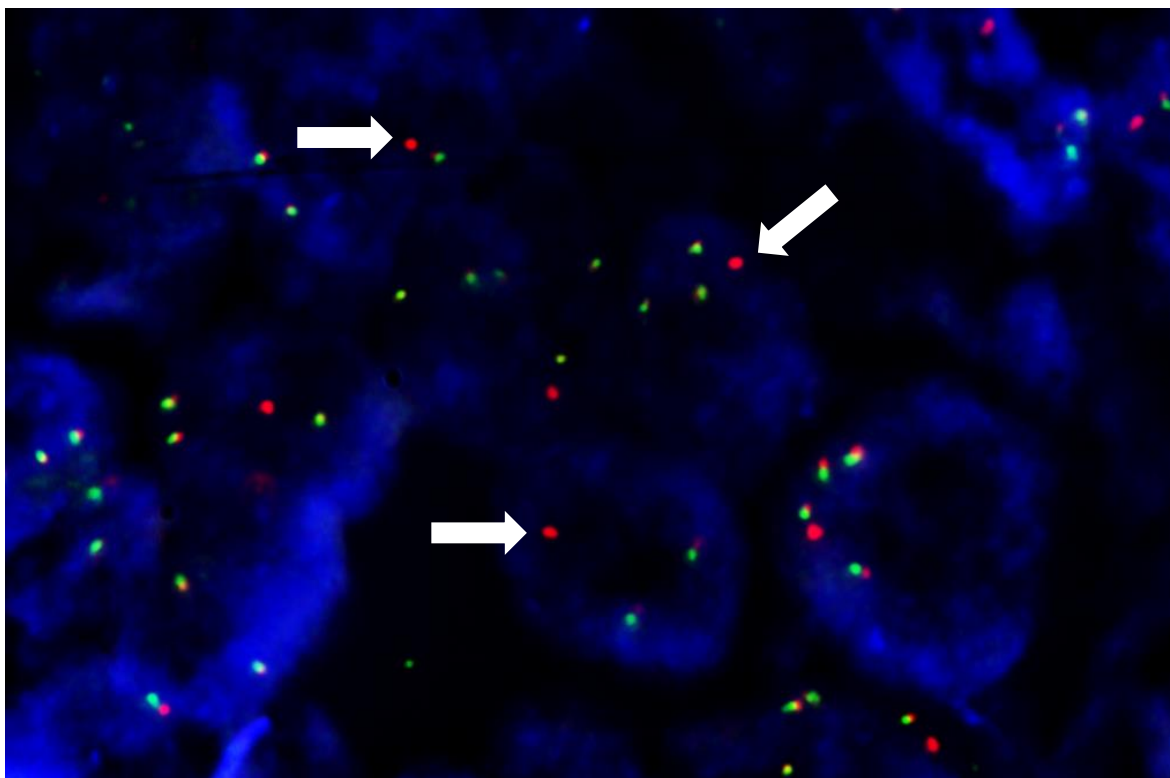
Tabuľka č. II zobrazuje princíp výpočtu priemerného počtu génov u konkrétneho pacienta s CTG č. 10967. Obdobným spôsobom ako hodnotenie génu ALK boli počítané pomery pre ROS1, RET a NTRK1. Výnimka u RET génu spočívala v hodnotení percenta fúzných signálov (translokačná próba) a nie rozštiepených ako v prípade ALK, ROS1 a NTRK1 (break-apart próby).

Použitím FISH zobrazovacieho systému ISIS (MetaSystems), špecifických fluorescenčných filtrov a CCD kamery boli následné získané reprezentatívne snímky použitých DNA prób a pozorovaných genetických aberácií v rámci sledovanej skupiny pacientov s NSCLC. Vid' obrázok č. 6-9.

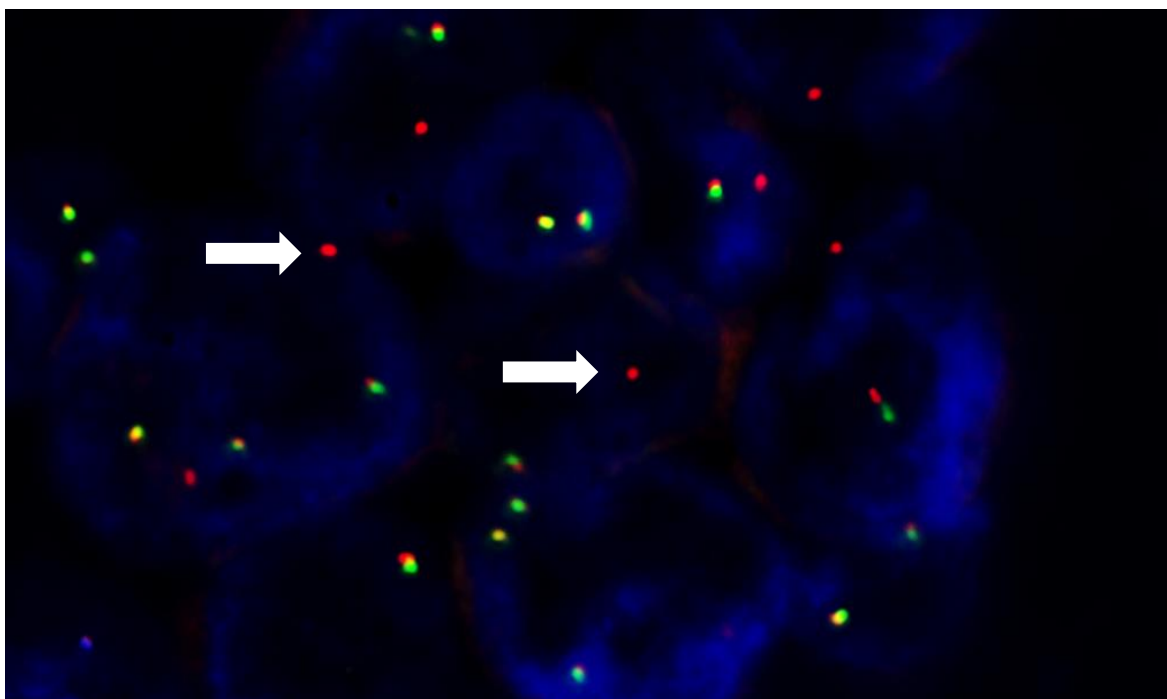
V súhrnných tabuľkách č. III a IV sú uvedené získané hodnoty po odčítaní signálov pre jednotlivé vyšetrené gény a centroméry príslušných chromozómov. Údaje sú zapísané systémom 0/1, v ktorom 0 = nenavýšenie kópií génu/centromér chromozómov alebo negatívny status prítomnosti aberácie (translokácie, fúzie), 1 = zvýšenie kópií génu/centromér chromozómov alebo pozitívny status prítomnosti aberácie (translokácie, fúzie). Zaznamenané výsledky boli v ďalšom kroku štatisticky spracované pomocou softwaru R (www.r-project.org) a niektoré štatisticky významné hodnoty boli korelované s dostupnými klinicko-patologickým dátam pacientov.

Tabuľka č. II: Príklad výpočítania hodnôt a pomerov u pacienta s CTG č. 10967.

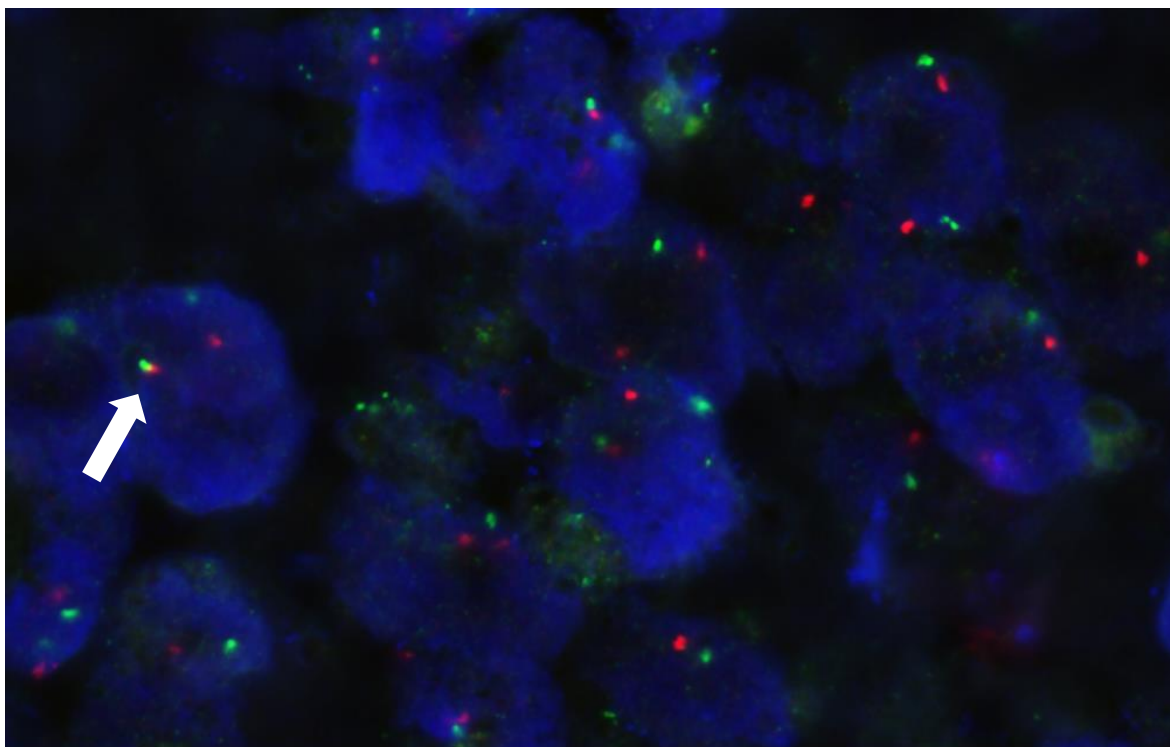
CTG: 10967					
Hodnotenie génu EGFR					
CEP7	EGFR	Počet		Počet CEP7	Počet EGFR
2	2	39		78	78
6	6	4		24	24
1	1	4		4	4
1	2	2		2	4
4	4	15		60	60
4	3	1		4	3
3	3	25		75	75
7	7	2		14	14
2	3	1		2	3
2	1	3		6	3
3	2	4		12	8
celkový počet na 100 bunkových jadier:				280	276
priemerný počet:				2,81	2,76
gén/chromozóm:				0,98	
Hodnotenie génu ALK					
ALK green	ALK orange	Počet		Počet ALK green	Počet ALK orange
2	2	59		118	118
2	3	3		6	9
3	3	9		27	27
1	3	1		1	3
1	2	5		5	10
1	1	3		23	23
celkový počet na 100 bunkových jadier:				180	190
priemerný počet:				1,80	1,90
ALK translokácia:				20 % (pozit.)	



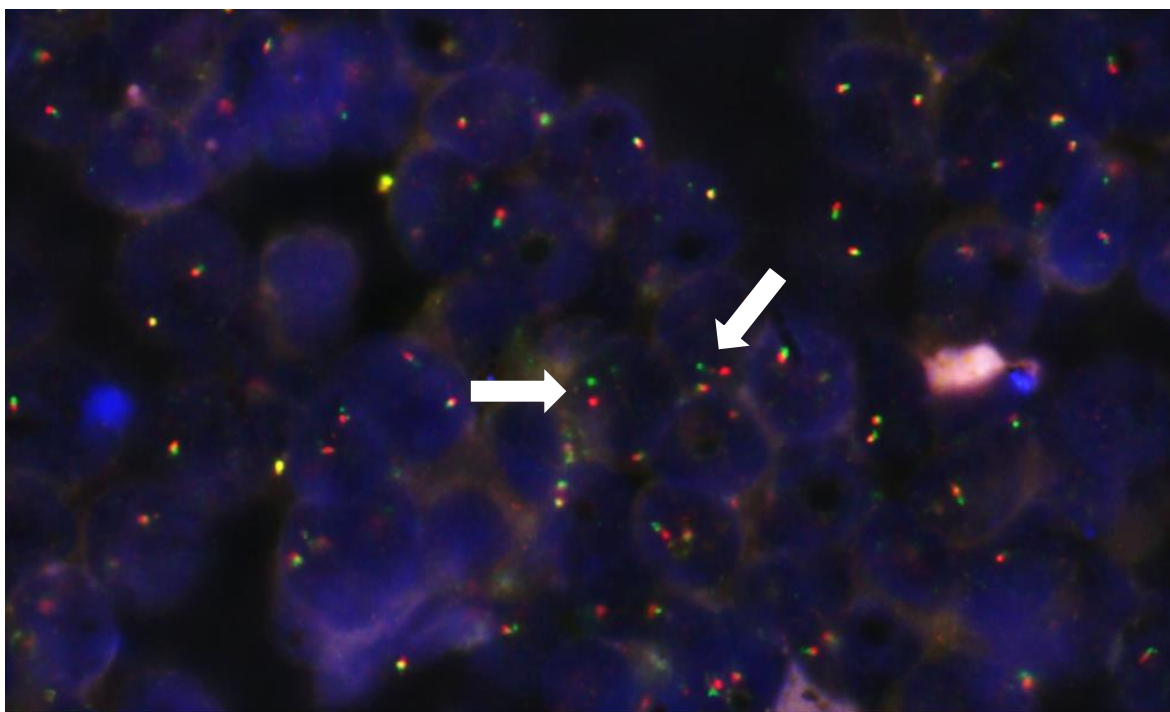
Obrázok č.6: Fluorescenčná DNA próba pre analýzu génu ALK (ALK Break próba) u pacienta s CTG č. 10967. Biele šípky označujú tzv. *single red* signály.



Obrázok č.7: Fluorescenčná DNA próba u ALK-pozitívneho pacienta s CTG č. 11624. Biele šípky označujú detegované translokácie (*single red* signály).



Obrázok č.8: Fluorescenčná DNA próba pre RET (Spectrum Green) a KIF5B (Spectrum Orange). Biela šípka označuje fúzny signál RET/KIF5B u pacienta s CTG č. 11378.



Obrázok č.9: Fluorescenčná DNA Break Apart NTRK1 próba. Biele šípky označujú rozštiepené signály odpovedajúce translokáciám u pacienta s CTG č. 11072

Tabuľka č. III: Získané výsledky pre vyšetrované gény CEP7/EGFR, ALK a ROS1.

Poradie	CTG	Pohlavie	Rok narodenia	Fajčiar/ka	CEP7	CEP7 polyzómia	EGFR	EGFR amplifikácia	Pomer EGFR/CEP7	ALK green	ALK green amplifikácia	ALK orange	ALK orange amplifikácia	ALK translokácia	ROS1 green	ROS1 green amplifikácia	ROS1 orange	ROS1 orange amplifikácia	ROS1 translokácia
1.	10896	Ž	1950	ex	2,52	1	2,51	1	0	2,23	0	2,24	0	0	1,96	0	1,89	0	0
2.	10967	Ž	1970	nie	2,81	0	2,76	1	0	1,8	0	1,9	0	1	1,98	0	2,06	0	0
3.	10978	Ž	1966	nie	2,11	0	1,96	0	0	1,84	1	2,39	1	1	1,82	0	1,81	0	0
4.	11011	M	1943	ex	2,18	0	2,18	0	0	2,75	1	2,75	1	0	1,95	0	2	0	0
5.	11014	Ž	1949	áno	2,25	1	2,13	0	0	2,51	1	2,61	1	0	2,9	1	2,97	1	0
6.	11015	Ž	1949	ex	2,17	1	2,06	0	0	2,09	0	2,05	0	0	2	0	2,1	1	0
7.	11016	M	1950	áno	2,24	1	2,2	1	0	2,02	0	2,02	0	0	2,12	0	2,13	0	0
8.	11071	Ž	1973	nie	2,78	1	2,67	1	0	2,19	0	2,2	0	0	2,07	0	2,08	0	0
9.	11158	M	1948	áno	2,01	0	1,91	0	0	2,01	0	2,02	0	0	2,23	0	2,24	0	0
10.	11164	Ž	1946	nie	3,62	1	3,55	1	0	2,39	1	2,41	1	0	3,2	1	3,23	1	0
11.	11168	Ž	1943	ex	2,03	0	1,94	0	0	1,98	0	2,02	0	0	3,37	1	3,37	1	0
12.	11169	M	1955	ex	1,99	0	1,82	0	0	3,53	1	3,54	1	0	2,9	1	2,92	1	0
13.	11189	M	1949	áno	1,9	0	1,91	0	0	1,87	0	1,88	0	0	2,05	0	2,05	0	0
14.	11192	Ž	1950	neuv.	2,08	0	2,24	0	0	2,11	0	2,12	0	0	2,21	0	2,23	0	0
15.	11224	Ž	1939	nie	2,21	1	2,11	0	0	1,99	0	2,02	0	0	2,4	1	2,4	1	0
16.	11339	M	1951	áno	3,5	1	3,52	1	0	3,91	1	3,94	1	0	3,01	1	3,03	1	0
17.	11346	Ž	1977	nie	2,14	0	2,13	0	0	2,15	0	2,17	0	0	2,08	0	2,14	0	0
18.	11358	M	1947	ex	2,29	0	2,27	0	0	2,53	1	2,53	1	0	2,14	0	2,17	0	0
19.	11359	M	1976	áno	2,22	0	2,16	0	0	2,45	1	2,47	1	0	2,31	1	2,36	1	0
20.	11378	Ž	1953	áno	2,9	1	2,89	1	0	2,46	1	2,46	1	0	2,11	0	2,14	0	0

Poradie	CTG	Pohlavie	Rok narodenia	Fajčiar/ka	CEP7	CEP7 polyzómia	EGFR	EGFR amplifikácia	Pomer EGFR/CEP7	ALK green	ALK green amplifikácia	ALK orange	ALK orange amplifikácia	ALK translokácia	ROS1 green	ROS1 green amplifikácia	ROS1 orange	ROS1 orange amplifikácia	ROS1 translokácia
21.	11391	Ž	1948	áno	2,18	0	2,35	0	0	2,8	1	2,85	1	0	2,08	0	2,1	0	0
22.	11554	Ž	1955	nie	2,96	1	3,8	1	0	2,25	1	2,25	1	0	2,18	0	2,18	0	0
23.	11571	M	1952	ex	2,18	0	2,21	0	0	1,93	0	1,93	0	0	2,13	0	2,13	0	0
24.	11580	Ž	1947	áno	2,71	1	2,89	1	0	2,32	1	2,32	1	0	2,04	0	2,04	0	0
25.	11624	M	1992	nie	2,11	0	2,11	0	0	1,93	0	2,62	1	1	2,02	0	2,02	0	0
26.	11488	M	1948	áno	2,14	0	2,25	0	0	2,26	0	2,26	0	0	2,22	0	2,22	0	0
27.	11489	M	1977	nie	2,09	0	2,16	0	0	1,99	0	2	0	0	2,09	0	2,1	0	0
28.	11522	Ž	1960	neuv.	2,73	1	2,73	1	0	2,9	1	2,9	1	0	2,58	1	2,6	1	0
29.	11534	M	1948	neuv.	2,33	0	2,39	0	0	2,11	0	2,11	0	0	2,15	0	2,13	0	0
30.	11542	M	1961	áno	3,18	1	3,45	1	1	2,21	0	2,21	0	0	2,11	0	2,11	0	0
31.	11567	M	1961	ex	2,01	0	2,01	0	0	2,18	0	2,18	0	0	2,27	0	2,29	0	0
32.	11058	M	1956	neuv.	2,57	1	2,02	0	0	2,11	0	2,12	0	0	2,33	1	2,32	0	0
33.	11149	M	1961	neuv.	3,52	1	3,44	1	0	3,84	1	3,86	1	0	4,08	1	4,08	1	0
34.	11203	M	1946	neuv.	2,2	1	2,14	1	0	2,5	1	2,51	1	0	2,27	1	2,29	1	0
35.	11267	M	1933	neuv.	2,37	1	5,82	1	1	2,22	0	2,22	0	0	2,37	1	2,36	1	0
36.	11271	Ž	1949	neuv.	2,77	1	2,71	1	0	1,96	0	2,04	0	1	2,44	1	2,45	1	0
37.	11317	Ž	1943	neuv.	2,01	0	2,13	1	0	2,06	0	2,08	0	0	2,2	0	2,21	0	0
38.	11362	Ž	1944	neuv.	2,09	0	2,93	1	1	2,49	1	2,52	1	0	1,92	0	1,97	0	0
39.	11369	Ž	1951	neuv.	2,25	0	2,22	0	0	2,16	0	2,21	0	0	2,15	0	2,19	0	0
40.	11072	Ž	1950	neuv.	2,14	0	2,2	0	0	2,1	0	2,1	0	0	2,09	0	2,09	0	0

Pokračovanie tabuľky č. III

Legenda:

CTG – cytogenetické číslo priradené na ÚMTM

Ž – žena / M – muž

ex – bývalý/á fajčiar/ka / neuv. – neuvedené

nehod. – nehodnotiteľný preparát

Tabuľka č. IV : Získané výsledky pre gény RET/KIF5B a NTRK1.

Poradie	CTG	Pohlavie	Rok narodenia	Fajčiar/ka	RET	RET amplifikácia	KIF5B	KIF5B amplifikácia	RET fúzia	NTRK1 green	NTRK1 green amplifikácia	NTRK1 orange	NTRK1 orange amplifikácia	NTRK1 translokácia
1.	10896	Ž	1950	ex	2,04	0	2,11	0	0	2,55	1	2,57	1	0
2.	10967	Ž	1970	nie	2,11	0	2,04	0	0	2,21	0	2,24	0	0
3.	10978	Ž	1966	nie	1,75	0	1,72	0	0	2,26	1	2,29	1	0
4.	11011	M	1943	ex	2,69	1	2,71	1	0	2,93	1	2,92	1	0
5.	11014	Ž	1949	áno	2,97	1	2,98	1	0	3	1	3,01	1	0
6.	11015	Ž	1949	ex	2,16	0	2,15	0	0	2,35	1	2,36	1	0
7.	11016	M	1950	áno	1,9	0	1,89	0	0	2,22	0	2,23	0	0
8.	11071	Ž	1973	nie	2,23	0	2,23	0	0	2,5	1	2,52	1	0
9.	11158	M	1948	áno	1,88	0	2,07	0	0	2,04	0	2,05	0	0
10.	11164	Ž	1946	nie	1,83	0	1,85	0	0	3,25	1	3,26	1	0
11.	11168	Ž	1943	ex	nehod.	0	nehod.	0	0	2,26	0	2,3	0	0
12.	11169	M	1955	ex	1,96	0	1,89	0	0	2,45	1	2,48	1	0
13.	11189	M	1949	áno	1,92	0	1,7	0	0	2,16	0	2,18	0	0
14.	11192	Ž	1950	neuv.	2,11	0	2,1	0	0	2,41	1	2,41	1	0
15.	11224	Ž	1939	nie	2,56	1	2,57	1	0	2,74	1	2,8	1	1
16.	11339	M	1951	áno	1,84	0	1,64	0	0	2,79	1	2,79	1	0
17.	11346	Ž	1977	nie	2,06	0	2,02	0	0	2,23	0	2,25	0	0
18.	11358	M	1947	ex	2,27	1	2,25	1	0	2,58	1	2,62	1	0
19.	11359	M	1976	áno	2,19	1	2,21	1	0	2,23	0	2,27	0	0
20.	11378	Ž	1953	áno	nehod.	0	nehod.	0	0	3	1	3,02	1	0

Poradie	CTG	Pohlavie	Rok narodenia	Fajčiar/ka	RET	RET amplifikácia	KIF5B	KIF5B amplifikácia	RET fúzia	NTRK1 green	NTRK1 green amplifikácia	NTRK1 orange	NTRK1 orange amplifikácia	NTRK1 translokácia
21.	11391	Ž	1948	áno	nehod.	nehod.	nehod.	1	0	2,92	1	2,93	1	0
22.	11554	Ž	1955	nie	2,01	0	1,97	0	0	2,49	1	2,5	1	0
23.	11571	M	1952	ex	1,81	0	1,92	0	0	2,89	1	2,92	1	0
24.	11580	Ž	1947	áno	1,78	0	2,1	1	0	3,1	1	3,14	1	0
25.	11624	M	1992	nie	1,83	0	1,87	0	0	2,3	1	2,31	1	0
26.	11488	M	1948	áno	1,93	0	1,97	0	0	2,12	0	2,19	0	nehod.
27.	11489	M	1977	nie	2,69	1	2,69	1	0	2,87	1	2,91	1	0
28.	11522	Ž	1960	neuv.	2,54	1	2,56	1	0	2,64	1	2,68	1	0
29.	11534	M	1948	neuv.	2,3	1	2,34	1	0	3,06	1	3,06	1	0
30.	11542	M	1961	áno	2,18	0	2,2	0	0	1,94	0	1,96	0	0
31.	11567	M	1961	ex	2,1	0	2,13	0	0	2,76	1	2,8	1	0
32.	11058	M	1956	neuv.	2,01	0	2,04	0	0	2,53	1	2,56	1	0
33.	11149	M	1961	neuv.	2,36	1	2,36	0	0	2,61	1	2,63	1	0
34.	11203	M	1946	neuv.	1,83	0	1,97	0	0	2,07	0	2,17	0	1
35.	11267	M	1933	neuv.	2,32	0	2,3	0	0	2,65	1	2,65	1	0
36.	11271	Ž	1949	neuv.	2,2	0	2,23	0	0	2,93	1	2,95	1	1
37.	11317	Ž	1943	neuv.	2,08	0	2,06	0	0	2,57	1	2,56	1	0
38.	11362	Ž	1944	neuv.	2,27	1	2,28	1	0	2,04	0	2,04	0	0
39.	11369	Ž	1951	neuv.	1,9	0	1,88	0	0	1,98	0	2,03	0	0
40.	11072	Ž	1950	neuv.	2,02	0	2,05	0	0	2,36	1	2,42	1	1

Pokračovanie tabuľky č. IV

Legenda:

CTG – cytogenetické číslo priradené na ÚMTM

Ž – žena / M – muž

ex – bývalý/á fajčiar/ka / neuv. – neuvedené

nehod. – nehodnotiteľný preparát

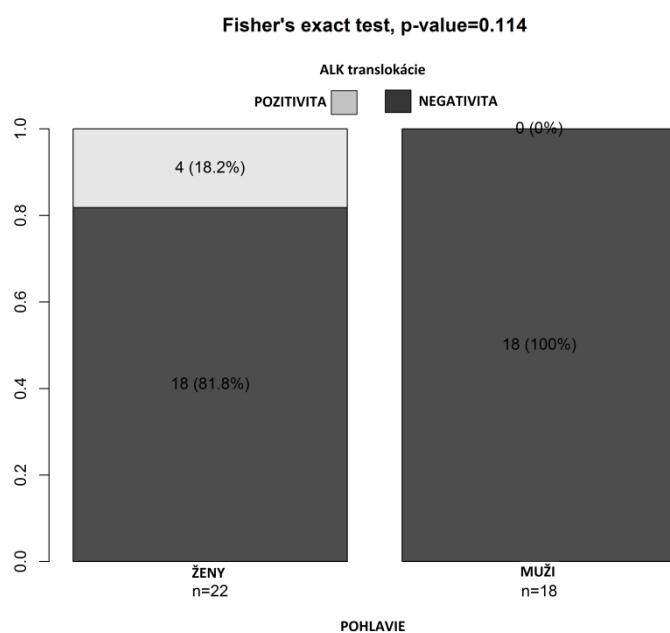
Nie všetky štatisticky získané výsledky mali dostatočnú výpovednú hodnotu na vyvodenie jednoznačného záveru. Vzhľadom na malý počet pacientov v sledovanej skupine a neúplnosti dostupných klinicko-patologických dát je potrebné na čiastočne dosiahnuté výsledky pozerat' s nadhľadom. V tejto časti je uvedených pár príkladov štatistického hodnotenia použitím Fisherovho exaktného testu.

Príkladom jedného z pozorovaných výsledkov, porovnaného s dostupnými publikáciami, bol zvýšený výskyt translokácií génu ALK u žien v porovnaní s výskytom u mužov. Zároveň boli translokácie zistené len u statusu nefajčiar/ka. Vid' tabuľka č. V.

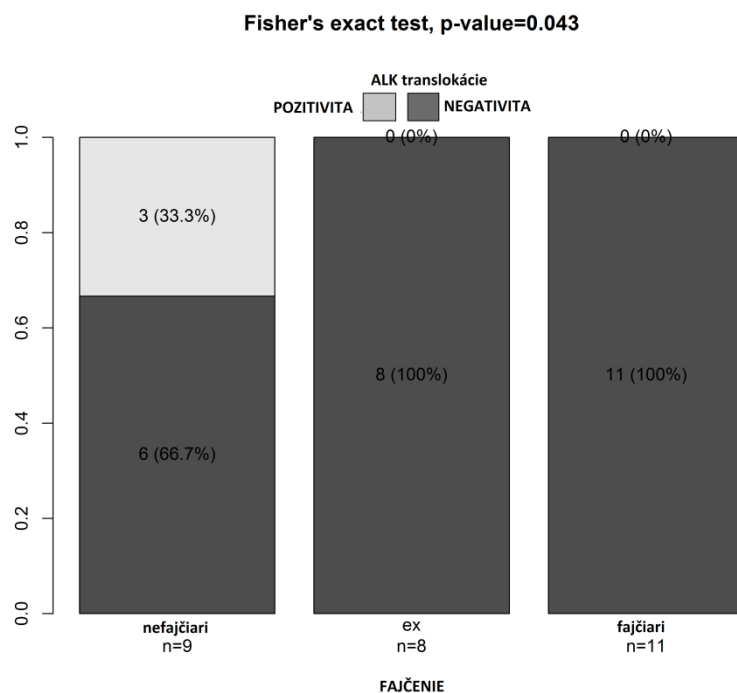
Rovnako vyšší výskyt translokácií génu NTRK1 bol pozorovaný u žien. Vid' tabuľka č. VI.

Tabuľka č. V : Výsledok štatistickej analýzy u pacientov s ALK translokáciou.

Translokácie ALK	Pohlavie		Fajčiar/ka		
	ženy	muži	áno	nie	bývalý/á
negativita	18/36 (50 %)	18/36 (50 %)	11/25 (44 %)	6/25 (24 %)	8/25 (32 %)
pozitivita	4/4 (100 %)	0/4 (0 %)	0/3 (0 %)	3/3 (100 %)	0/3 (0 %)



Graf č. 2: Výskyt ALK translokácií vzhľadom na pohlavie pacientov.



Graf č. 3: Výskyt ALK translokácií v súvislosti s fajčením.

Tabuľka č. VI: Výsledok štatistickej analýzy u NTRK1-pozitívnych pacientov.

Translokácie NTRK1	Pohlavie		Fajčiar/ka		
	ženy	muži	áno	nie	bývalý/á
negativita	19/35 (54,3 %)	16/35 (45,7 %)	10/26 (38,5 %)	8/26 (30,8 %)	8/26 (30,8 %)
pozitivita	3/4 (75 %)	1/4 (75 %)	0/0 (0 %)	1/1 (100 %)	0/0 (0 %)

Zo štatistickej analýzy vyplynul vzťah medzi zvýšeným počtom kópií génu ROS a zároveň zvýšením počtu signálov pre centromérickú CEP7, ktorý bol pozorovaný u 11/14 prípadov. Hodnota hladiny významnosti testu p-value bola rovná 0,005. Vid' tabuľka č. VII.

Tabuľka č. VII: Vzťah medzi génom ROS1 a oblasťou CEP7.

		ROS1	
		normál	amplifikácia
CEP7	dizómia	19/26 (73,1 %)	3/14 (21,4 %)
	polyzómia	7/26 (26,9 %)	11/14 (78,6 %)

Tabuľka č. VIII: Stručná súhrnná charakteristika sledovaných pacientov.

Charakteristika		Počet [%]
Pohlavie	ženy (21/40)	52,2
	muži (19/40)	47,5
Histologický subtyp	adeno (23/27)	85,19
	adeno-like (3/27)	11,11
	non-adeno (1/27)	3,70
	neuvedené (13/40)	32,5
Štádium ochorenia (Stage)	IA (8/28)	28,57
	IB (3/28)	10,71
	IIA (3/28)	10,71
	IIB (1/28)	3,57
	IIIA (5/28)	17,86
	IV (8/28)	28,57
	neuvedené (12/40)	30
Fajčiar/ka	áno (11/28)	39,29
	nie (9/28)	32,14
	bývalý/á (8/28)	28,57
	neuvedené (12/40)	30

Legenda:

adeno – adenokarcinóm

adeno -like – zahŕňa adenoskvamózny karcinóm, bazaloidný skvamózny karcinóm a iné

non- adeno – zahŕňa spinocelulárny karcinóm a iné

6. Diskusia

Napriek progresu v oblasti včasnej diagnostiky ostáva karcinóm pľúc naďalej ochorením s vysokou incidenciou a mortalitou. Avšak pokroky v genomike a molekulárnej biológii prinášajú vďaka identifikácii aberantných proteínov v nádorových bunkách nové ciele pre onkologickú liečbu. V minulosti bol jediným možným postupom pri liečbe pacienta s pokročilým a metastázujúcim karcinómom pľúc podanie chemoterapie, rádioterapia alebo chirurgický zákrok. Dnes sa stále viac uplatňuje liečba inhibíciou intracelulárnej kinázovej domény génu EGFR (receptor pre epidermový rastový faktor), prestavby aktivácie v géne ALK (anaplastic lymphoma kinase) a iných molekulárnych cieľov pomocou tyrozínkinázových inhibítorov (TKI). Preto práve poznanie a vhodné stanovenie týchto aberácií prispieva k určeniu najvhodnejšieho liečebného režimu u konkrétneho pacienta.

V rámci experimentálnej časti tejto bakalárskej práce bola pomocou izolácie bakteriálnych plazmidov PR11-339F13 so sekvenciou pre EGFR a PZ75 so sekvenciou CEP7 (oblasť centroméry chromozómu 7) pripravená fluorescenčne značená DNA próba. Za použitia pripravenej próby pre sledovanie prítomnosti mutácie génu EGFR a štyroch komerčne dostupných prôb pre gény ALK, ROS1, RET a NTRK1, bolo vyšetrených pomocou metódy FISH náhodne vybraných 40 pacientov.

Dostupných údaje preukázali, že pacientom v tejto skupine bol karcinóm pľúc diagnostikovaný v rokoch 2016-2017 a z hľadiska histologického subtypu prevažoval najmä adenokarcinóm 85,19 % (23/27). Práve adenokarcinóm je v rámci NSCLC najčastejšie sa vyskytujúci subtyp (www.cancer.org).

Štatistická analýza odčítaných fluorescenčných signálov pre jednotlivé gény bola prevedená pomocou softwaru R (www.r-project.org). Hladina významnosti bola nastavená na 5 %. Pre analýzu nezávislosti amplifikácií, translokácií a klinických faktorov bol použitý Pearsonov X^2 test nezávislosti, resp. Fisherov exaktný test pre kontingenčné tabuľky. Ten bol aplikovaný v situáciách, keď neboli splnené podmienky pre použitie X^2 testu. Pre hodnotenie ekvivalencie distribúcií spojitých premenných (vek, priemerný počet kópií génu) bol použitý Wilcoxonov exaktný test, Kruskalov-Wallisov test, resp. Studentov t-test.

Praktický význam pre pacientov s NSCLC má hodnotenie aberácie ALK. Frekvencia výskytu u NSCLC sa pohybuje v rozmedzí 3-7 %, v závislosti na stanovenej cut-off hodnotone k posúdeniu pozitivity. V tejto práci bola cut-off hodnota pre ALK translokácie

prevzatá zo štúdie autorov Kwak *et al.*, v ktorej za FISH-pozitívne vzorky boli považované tie, v ktorých viac ako 15 % jadier vykazovalo rozštiepenosť signálov (Kwak *et al.*, 2010). (Rovnakým kritériom, cut-off >15 %, bola následne hodnotená pozitivita translokácií ROS1, NTRK1 a fúzií RET.) Práve pri štatistickom hodnotení ALK aberácií boli zistené významné skutočnosti. Výskyt bol potvrdený v 10 % (4/40), zaujímavosťou bolo, že išlo o ženy (4/4), nefajčiarky (3/3, $p = 0,04$) a zároveň o adenokarcinómy s metastázujúcim statusom ($p = 0,02$). Hodnotným výsledkom bol aj median veku odpovedajúci 45,9 rokom ($p = 0,03$), čo by korelovalo s faktom, že ALK-pozitívni sú prevažne pacienti mladšieho veku (Inamura *et al.*, 2009). Samozrejme aj tu je opäť potrebné zohľadniť veľkosť analyzovanej skupiny.

Prítomnosť prestavby génu RET nebola preukázaná ani v jednom prípade. Tento fakt mohol byť opäť spôsobený malým súborom sledovaných pacientov. V publikáciách sa uvádza, že frekvencia výskytu býva ~ 1 % a bolo tiež preukázané, že súvisí s citlivosťou na multi-kinázové inhibítory vandetinib, sorafenib a sunitinib (Kohno *et al.*, 2012; Lipson *et al.*, 2012). Avšak v 90 % (9/10, $p = 0,00$) prípadov sa preukázalo, že zvýšenie počtu kópií génu RET bolo sprevádzané so zvýšením počtu kópií génu KIF5B, čo potvrdilo vzťah ako častých fúzných partnerov (Kohno *et al.*, 2012).

Rovnako ako v prípade génu RET sa nepreukázali v sledovanej skupine ani aberácie génu ROS1. Avšak zaujímavý jav bol pozorovaný až v 78,6 % (11/14, $p = 0,005$) prípadov, keď s navýšením počtu kópií ROS1 génu bol zároveň navýšený počet signálov CEP7. Keďže CEP7 je centromérická próba pre chromozóm 7, na ktorom leží gén EGFR, je možné uvažovať, že by početnosť génu ROS1 mohla mať súvislosť so samotným génom EGFR a počtom jeho kópií. V jednom z predklinických testovaní sa preukázala znížená citlivosť bunkovej línie HCC78 (expresia SLC34A2/ROS1) voči podaniu EGFR-inhibítorov, ktoré neovplyvnili proliferáciu tejto línie. Zároveň z toho vyplynulo, že by rezistencia mohla súvisieť s EGFR aktiváciou (Davies *et al.*, 2012).

Vaishnavi *et al.* viedli štúdiu, v ktorej zistili 3,3 % (3/91) výskyt prestavby génu NTRK1 u pľúcneho karcinómu. Podľa tejto štúdie sa translokácie NTRK1 neprekrývali so žiadnou inou onkologickou aberáciou (Vaishnavi *et al.*, 2013). V rámci tejto práce bola translokácia NTRK1 génu identifikovaná v 10 % (4/40) prípadov, z toho v 75 % (3/4) išlo o ženy a z dostupných klinicko-patologických dát vyplynulo, že všetky boli nefajčiarky s adenokarcinómom. Zároveň sa u nich nepreukázala prítomnosť mutácie génu EGFR, BRAF, ALK ani RET, čo by približne odpovedalo aj výsledkom vyššie spomenutej štúdie.

Štatická analýza odhadu prežívania v nasledujúcich 6 mesiacoch tiež neposkytla relevantné výsledky, čo súviselo s malým počtom „eventov“ (úmrtí) v sledovanej skupine, ale ľudského hľadiska je táto skutočnosť veľmi pozitívna.

Vybraná skupina 40 pacientov teda po vyšetrení vykazovala v niektorých kategóriach hodnotenia štatisticky sľubné vzťahy, preto ostáva naďalej pozorovaná. V prípade možnosti budú do budúcnosti vyšetrené perspektívne patientské vzorky, čo by mohlo prispieť k pochopeniu významu vybraných prediktívnych biomakerov v predikcii ďalšieho vývoja ochorenia, účinnosť terapeutickéj stratégie a upresnenie vyšetrovaných biomakerov eventuálne použiteľných v rutínnej praxi.

7. Záver

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo spracovanie literárnej rešerše zaoberajúce sa nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC), molekulárnymi metódami v rámci nádorovej cytogenetiky, ktoré majú najmä diagnostický význam a prediktívnymi genetickými biomarkerami. Prediktívne biomarkery sú v onkológii využívané hlavne ako nástroj predpovedania odpovede nádoru na liečbu a tiež hodnotenie účinnosti prípadne toxicity tejto liečby. Informácie o významných chromozómových aberáciách spojených s konkrétnym typom onkologickej malignity poskytuje fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH).

Metódou FISH bola vyšetrená skupina náhodne vybratých 40 pacientov na prítomnosť možných mutácií v génoch EGFR, ALK, ROS1, RET a NTRK1. Aj napriek malému súboru pacientov boli pozorované niektoré štatisticky významné vzťahy, ktoré boli popísané v dostupných publikáciách. Nie všetky výsledky však boli plnohodnotné vzhľadom na dostupnosť klinicko-patologických dát. Práca bola poňatá ako pilotná, skupina pacientov ostáva naďalej sledovaná, aby do budúcnosti mohol byť zistený vplyv vyhodnotených aberácií na prognózu alebo účinnosť cielej liečby a mohli byť buď potvrdené, alebo vyvrátené získané korelácie.

8. Zoznam použitej literatúry

Články z odbornej publikácie:

Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet.* 2003;34(4):369-376. doi:10.1038/ng1215.

Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012;30(8):863-870. doi:10.1200/JCO.2011.35.6345.

Bhatt AN, Mathur R, Farooque A, Verma A, Dwarakanath BS. Cancer biomarkers - current perspectives. *Indian J Med Res.* 2010;132(8):129-149.

Birch AH, Arcand SL, Oros KK, et al. Chromosome 3 anomalies investigated by genome wide SNP analysis of benign, low malignant potential and low grade ovarian serous tumours. *PLoS One.* 2011;6(12). doi:10.1371/journal.pone.0028250.

Cremer T, Landegent JE, Bruckner A, et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and nonradioactive *in situ* hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum. Genet.* 1986;74:346–352.

Davies KD, Le AT, Theodoro MF, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(17):4570-4579. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0550.

Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(5):1472-1482. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2906.

Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1969;63:378–383.

Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 1996;78(6):1284-1292. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960915)78:6<1284::AID-CNCR17>3.0.CO;2-X.

- Gu TL, Deng X, Huang F, et al. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2011;6(1). doi:10.1371/journal.pone.0015640.
- Halling KC, Kipp BR. Fluorescence in situ hybridization in diagnostic cytology. *Hum Pathol*. 2007;38(8):1137-1144. doi:10.1016/j.humpath.2007.04.015.
- Heuckmann JM, Hölzel M, Sos ML, et al. ALK mutations conferring differential resistance to structurally diverse ALK inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(23):7394-7401. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1648.
- Hodgson JT, Darnton a. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg*. 2000;44(8):565-601. doi:10.1093/annhyg/44.8.565.
- Hwang SJ, Cheng LSC, Lozano G, Amos CI, Gu X, Strong LC. Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: Association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk. *Hum Genet*. 2003;113(3):238-243. doi:10.1007/s00439-003-0968-7.
- Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T. et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N. Engl. J. Med*. 2010; 363(18):1734–1739. doi: 10.1056/NEJMoa1007478.
- Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*. 2009;22(4):508-515. doi:10.1038/modpathol.2009.2.
- Ju YS, Lee W-C, Shin J-Y, et al. Fusion of KIF5B and RET transforming gene in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res*. 2011;436-445. doi:10.1101/gr.133645.111.
- Jun HJ, Johnson H, Bronson RT, De Feraudy S, White F, Charest A. The oncogenic lung cancer fusion kinase CD74-ROS activates a novel invasiveness pathway through E-syt1 phosphorylation. *Cancer Res*. 2012;72(15):3764-3774. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3990.

- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-821. doi: 10.1126/science.1359641.
- Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B. et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci. Transl. Med*. 2012;4(120):120ra17. doi:10.1126/scitranslmed.3003316.
- Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, Colditz GA. Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tob Control*. 2008;17(3):198-204. doi:10.1136/tc.2007.022582.
- Kohno T. Promise of vandetanib, a FDA-approved RET kinase inhibitor, for the treatment of RET fusion-positive lung adenocarcinoma. *Transl Cancer Res*. 2016;5(S2):S237-S239. doi:10.21037/tcr.2016.08.10.
- Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature Medicine*. 2012;18(3):375-377. doi:10.1038/nm.2644.
- Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M. et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nature medicine*. 2012;18(3):382-384. doi:10.1038/nm.2673
- Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature*. 1986;319(6056):743–748.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263(5151):1281–1284. doi:10.1126/science.8122112.
- Muscat JE, Stellman SD, Zhang ZF, Neugut AI. Cigarette smoking and large cell carcinoma of the lung. *Biomarkers Prev*. 1997;6(7):477-480.
- Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett*. 2001;169(2):107-114. doi:10.1016/S0304-3835(01)00530-4.

- Nanjangud G, Rao PH, Hegde A, Teruya-Feldstein J, Donnelly G, Qin J. et al. Spectral karyotyping identifies new rearrangements, translocations, and clinical associations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2002;99(7):2554–2561. doi:10.1182/blood.V99.7.2554.
- Nowell O, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
- Okines A, Cunningham D, Chau I. Targeting the human EGFR family in esophagogastric cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(8):492-503. doi:10.1038/nrclinonc.2011.45.
- Owonikoko TK, Ragin CC, Belani CP, et al. Lung cancer in elderly patients: An analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database. *J Clin Oncol*. 2007;25(35):5570-5577. doi:10.1200/JCO.2007.12.5435.
- Palmer JD, Zaorsky NG, Witek M, Lu B. Molecular markers to predict clinical outcome and radiation induced toxicity in lung cancer. *J Thorac Dis*. 2014;6(4):387-398. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.04.
- Phay JE, Shah MH. Targeting RET receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(24):5936-5941. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0786.
- Priatelová I, Janíčková N, Marinčák M. Stereotaktická rádioterapia karcinómu pľúc. *Onkológia*. 2013;8(5):288-292.
- Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize *ALK*-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(16):5216-5223. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0802.
- Rudkin GT, Stollar BD. High resolution detection of DNA.RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. *Nature*. 1977;265:472–473.
- Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, et al. CH5424802, a Selective ALK Inhibitor Capable of Blocking the Resistant Gatekeeper Mutant. *Cancer Cell*. 2011;19(5):679-690. doi:10.1016/j.ccr.2011.04.004.

Sandberg AA, Meloni-Ehrig AM. Cytogenetics and genetics of human cancer: Methods and accomplishments. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;203(2):102-126. doi:10.1016/j.cancergencyto.2010.10.004.

Sang J, Acquaviva J, Friedland JC, et al. Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer discovery.* 2013;3(4):430-443. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0440.

Sasaki T, Okuda K, Zheng W, et al. The neuroblastoma associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK translocated cancers. *Cancer research.* 2010;70(24):10038-10043. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2956.

Schröck E, Manoir SD, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D. et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science.* 1996;273(5274):494-497. doi:10.1126/science.273.5274.494.

Shtivelman E, Hensing T, Simon GR, et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. *Oncotarget.* 2014;5(6):1392-1433. doi:10.18632/oncotarget.1891.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Gene Chromosome Canc.* 1997;20(4):399-407. doi: 10.1002/(SICI)1098-2264(199712)20:4<399::AID-GCC12>3.3.CO;2-L.

Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561-566. doi:10.1038/nature05945.

Sossin WS. Tracing the evolution and function of the Trk superfamily of receptor tyrosine kinases. *Brain Behav Evol.* 2006;68:145-156. doi:10.1159/000094084.

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 1996;12:368-375. PMID:8630489; <http://dx.doi.org/10.1038/ng0496-368>.

Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics.* 2005;6:782–792. doi:10.1038/nrg1692.

Takeuchi K, Young LC, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(9):3143-3149. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3248.

Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med.* 2012;18(3):378-381. doi:10.1038/nm.2658.

Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas.* 1956;42:1–6. doi:10.1111/j.1601-5223.1956.tb03010.x.

Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, et al. KLC1-ALK: A novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin embedded tissue only. *PLoS One.* 2012;7(2): e31323. doi:10.1371/journal.pone.0031323.

Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. Oncogenic and drug sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nature medicine.* 2013;19(11):1469-1472. doi:10.1038/nm.3352.

Wang R, Hu H, Pan Y, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(35):4352-4359. doi:10.1200/JCO.2012.44.1477.

Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(3):288-300. doi:10.21037/tlcr.2016.06.07.

Internetové zdroje:

National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011.

Dostupné na <http://seer.cancer.gov>. (Navštívené 13.03. 2017)

Lovly CL, Horn WP. ALK. *My Cancer Genome.* 2015.

Dostupné na <https://www.mycancergenome.org>. (Navštívené 15.03. 2017)

Cancer Statistics 2016.

Dostupné na <https://www.cancer.org>. (Navštívené 17.03. 2017)

The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. 2014.

Dostupné na <https://www.surgeongeneral.gov>. (Navštívené 13.03. 2017)

<https://www.svod.cz> (Navštívené 21.03. 2017)

Knižné zdroje:

FORETOVÁ, Lenka - SVOBODA, Marek – SLABÝ, Ondřej a kol. 2014. *Molekulární genetika v onkologii*. 1. vyd. Praha : Mladá fronta a. s., 2014. 27-57 s. ISBN 978-80-204-3236-0.

REČKOVÁ, Mária a kol. 2014. *Vybrané kapitoly z klinickej onkológie*. 1. vyd. Bratislava : ROWEX, spol. s. r. o., 2014. 49-50 s. ISBN 978-80-969863-6-1.

9. Zoznam použitých skratiek

ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ALCL	anaplastic large cell lymphoma – anaplastický veľkobunkový lymfóm
AKT	RAC-beta serine/threonine-protein kinase – proteínkináza
ALK	anaplastic lymphoma kinase – kináza anaplastického lymfómu
AR	amphiregulin
ARTN	artemin
ATP	adenozíntrifosfát
BCR	breakpoint cluster region protein
BRAF	V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BED	biologická efektívna dávka
BTC	betacellulin
c-KIT	mast/stem cell growth factor receptor
c-MET	receptor hepatocytárneho rastového faktora
CCDC6	coiled-coil domain-containing protein 6
CD74	molecule (invariant polypeptide of major histocompatibility complex)
CEP	centromeric enumeration probes
CEP7	centromerická próba pre chromozóm 7
CGH	komparatívna genómová hybridizácia
CLIP1	CAP-Gly domain containing linker protein 1
CML	chronická myeloidna leukémia
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonucleotide acid – deoxyribonukleová kyselina
dUTP	2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
EDTA	etyléndiamíntetraoctová kyselina

EGFR	epidermal growth factor receptor – receptor pre epidermový rastový faktor
EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4
ErbB	human epidermal growth factor receptor
EPR	epiregulin
ERCC1	DNA excision repair protein, excision repair cross-complementation group 1
ERF	ETS2 repressor factor
ERK	mitogen-activated protein kinase – mitogén-aktivovaná proteínkináza
EZR	ezrin
FDA	The Food and Drug Administration – Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded cores
FIG	fused in glioblastoma (gén kódujúci proteín)
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia
FLT4	fms related tyrosine kinase 4
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HER1 – 4	human epidermal growth factor receptor 1 – 4
HGFR	Met/hepatocyte growth factor receptor
HLA	human leukocyte antigen
HSP90	heat shock protein 90
HTR4	5-hydroxytryptamine receptor 4
I-FISH	interfázna FISH
IHC	immunohistochemistry – imunohistochémia
ISH	<i>in situ</i> hybridizácia
JNK	Jun amino-terminal kinase
KDR	kinase insert domain receptor
KIF5B	kinesin family member 5B
KLC1	kinesin light chain 1

KRAS	Kirsten murine sarcoma viral oncogene homolog (proteín z rodiny RAS)
LSI	locus specific identifier
M-FISH	multicolor FISH – mnohofarebná karyotypizácia
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDK	midkine
MEK	dual specificity mitogen-activated protein kinase
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
MHC II	hlavný histokompatibilný komplex II. triedy
MIF	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
MPRIIP	myosin phosphatase Rho-interacting protein
mTOR	mammalian target of rapamycin – cicavčí cieľ rapamycínu
NCI	National Cancer Institute
NCOA4	nuclear receptor coactivator 4
NGF	nerve growth factor
NPM1	nucleophosmin
NRG	neuregulin
NRTN	neurturin
NSCLC	non small cell lung cancer – nemalobunkový karcinóm pľúc
NTRK	neurotrophic receptor tyrosine kinase
p53	Tp53 tumor protein (transkripčný faktor)
PBS	phosphate-buffered saline – fosfátový pufer
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase – fosfatidylinositol-3-kináza
PLC- γ	phospholipase C gamma – fosfolipáza C gama
PSPN	persephin
PTC	papilárny karcinóm štítnej žľazy
PTN	pleiotrophin

RAF	raf proto-oncogene, serine/threonine kinase – proteínkináza
RAS	Rous adenosarcoma (proteín účastní pri prenose mitogénneho signálu)
RET	rearranged during transfection
RNA	ribonucleic acid – ribonukleová kyselina
ROS1	represor utlmenia génovej expresie
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
RTK	receptor tyrosine kinases – receptorové tyrozínkinázy
SBRT	extrakraniálna stereotaktická rádioterapia
SCLC	small cell lung cancer – malobunkový karcinóm pľúc
SDC4	syndecan 4
SKY	spektrálna karyotypizácia
SLC34A2	solute carrier family 34 member 2
SSC	saline-sodium citrate
STAT	signal transducer and activator of transcription
TFG	TRK-fused gene protein
TGF- α	transforming growth factor - transformačný rastový faktor
TKI	inhibítor tyrozínkináz
TP53	tumor protein p53
TPM3	tropomyosin 3
TRIM33	tripartite motif-containing protein 33
TRK	receptorová tyrozínkináza
TrkA	tropomyosin-related kinase A
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2
VEGFR3	vascular endothelial growth factor receptor 3
WCP	whole chromosome painting