

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Postupy a metody v aplikované molekulární onkologii

Kolektiv autorů RECAMO



2. obálka

Editorial

Vážení čtenáři,

v roce 2012 spatřilo světlo světa první supplementum projektu RECAMO, který realizuje Masarykův onkologický ústav. V uvedeném materiálu se výzkumný tým projektu, jenž zahrnuje nejen pracovníky výzkumné, ale i celou řadu pracovníků klinických, pokusil prezentovat výsledky dílčích vědecko-výzkumných aktivit. V supplementu se tak objevily odborné články s rozličnou tematikou, aby se čtenář obeznámil především s širší výzkumné problematiky. Soudě dle ústních ohlasů snad splnilo svůj účel.

Druhé supplementum časopisu Klinická onkologie připravené pracovníky RECAMO je více orientováno na praxi. Klade si tentokrát za cíl seznámit lékaře, kteří klinickou onkologií praktikují, s možnými aplikacemi výzkumných poznatků do praxe klinické onkologie. Jednotlivé příspěvky blíže popisují zvláště technologie, jež jsou nyní používány při základním výzkumu v nádorové biologii. O těchto technologiích se domníváme, že v určité, možná blízké, době se mohou uplatnit i v onkologické laboratorní diagnostice. Jedná se zejména o nové metody NGS a hmotnostní spektrometrie doplněné řadou metod zaměřených na analýzu cirkulujících buněčných elementů či metody, pomocí nichž sledujeme exprese cílových genů.

Jménem kolektivu autorů věřím, že toto supplementum přinese relativně ucelený pohled na široké spektrum metod aplikovatelných nejen v onkologickém výzkumu, ale i v budoucí laboratorní praxi a že si mezi vámi, klinickými lékaři, najde své čtenáře.

doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D.
výkonný ředitel RECAMO

Obsah | Contents

Editorial	S3
Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách Programmed Cell Death in Cancer Cells Ondroušková E., Vojtěšek B.	S7
Využití průtokové cytometrie pro analýzu mitochondriální buněčné smrti The Use of Flow Cytometry for Analysis of the Mitochondrial Cell Death Pekarčíková L., Knopfová L., Ondroušková E., Šmarda J.	S15
Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk Methods for Studying Tumor Cell Migration and Invasiveness Kovaříková P., Michalová E., Knopfová L., Bouchal P.	S22
Možnosti studia transendoteliální migrace <i>in vitro</i> Techniques to Study Transendothelial Migration <i>In Vitro</i> Knopfová L., Bouchal P., Šmarda J.	S28
Mechanismy lékové rezistence a nádorové kmenové buňky Mechanisms of Drug Resistance and Cancer Stem Cells Holčáková J., Nekulová M., Orzol P., Vojtěšek B.	S34
Funkční testy pro detekci nádorových kmenových buněk Functional Assays for Detection of Cancer Stem Cells Škoda J., Neradil J., Veselská R.	S42
Mikroprostředí nádoru – možnosti výzkumu v podmínkách <i>in vitro</i> Tumor Microenvironment – Possibilities of the Research Under <i>In Vitro</i> Conditions Chlapek P., Chovanová S., Sláviková V., Veselská R.	S48
Elektrochemická analýza nukleových kyselin, bílkovin a polysacharidů v biomedicině Electrochemical Analysis of Nucleic Acids, Proteins and Polysaccharides in Biomedicine Bartošík M., Paleček E., Vojtěšek B.	S53
Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice Koubková L., Vojtěšek B., Vyzula R.	S61
Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi Development of PCR Methods and Their Applications in Oncological Research and Practice Hrstka R., Kolářová T., Michalová E., Vojtěšek B.	S69
Metody pro studium protein-proteinových a protein-ligandových interakcí Methods for Analysis of Protein-protein and Protein-ligand Interactions Ďurech M., Trčka F., Vojtěšek B., Müller P.	S75
Detekce protein-proteinových interakcí metodami FRET a BRET Detection of Protein-protein Interactions by FRET and BRET Methods Matoulková E., Vojtěšek B.	S82
Detekce proteinů, proteinových interakcí a modifikací s využitím „proximity ligation assay“ <i>in situ</i> <i>In Situ</i> Proximity Ligation Assay for Detection of Proteins, Their Interactions and Modifications Brychtová V., Vojtěšek B.	S87

Expres a purifikace proteinů Protein Expression and Purification Růčková E., Müller P., Vojtěšek B.	S92
Kvantitativní hmotnostní spektrometrie a její využití v onkologii Quantitative Mass Spectrometry and Its Utilization in Oncology Hernychová L., Dvořáková P., Michalová E., Vojtěšek B.	S98
Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie Analysis of Protein Using Mass Spectrometry Dvořáková P., Hernychová L., Vojtěšek B.	S104
p-SRM, SWATH a HRM – cílené proteomické přístupy na hmotnostním spektrometru TripleTOF 5600+ a jejich aplikace v onkologickém výzkumu p-SRM, SWATH and HRM – Targeted Proteomics Approaches on TripleTOF 5600+ Mass Spectrometer and Their Applications in Oncology Research Faktor J., Michalová E., Bouchal P.	S110
Analýza fosfoproteinů a signálních dráh kvantitativno-proteomickými metodami Analysis of Phosphoproteins and Signaling Pathways by Quantitative Proteomics Pječová M., Hernychová L., Tomašec P., Wilkinson G. W., Vojtěšek B.	S116
Nové trendy ve studiu glykosylace proteinů u onkologických onemocnění New Trends in the Study of Protein Glycosylation in Oncological Diseases Zahradníková M., Hernychová L., Vojtěšek B., Novotný M. V.	S121
Současné trendy ve využívání PET radiofarmak k onkologické diagnostice Current Trends in Using PET Radiopharmaceuticals for Diagnostics in Oncology Adam J., Kadeřávek J., Kužel F., Vašina J., Řehák Z.	S129
„Techneciová krize“ – příčiny, možná řešení a dopad na diagnostiku planární scintigrafie a SPECT „Technetium Crisis“ – Causes, Possible Solutions and Consequences for Planar Scintigraphy and SPECT Diagnostics Adam J., Kadeřávek J., Kužel F., Vašina J., Řehák Z.	S137
Vitamin D jako významný steroidní hormon u karcinomu prsu Vitamin D as an Important Steroid Hormone in Breast Cancer Obermannová R., Demlová R., Drábová K., Melichárková K., Greplová K., Mrkvicová M., Zdražilová Dubská L., Vyzula R., Valík D.	S143

Bezplatná distribuce časopisu členům České onkologické společnosti České lékařské společnosti
Jana Evangelisty Purkyně je uskutečněna za podpory společnosti



Hlavní partner supplementa:



Další partneři supplementa:



Na tomto vydání se finančně spolupodílel Evropský fond pro regionální rozvoj a státní rozpočet České republiky (OP VaVpl – RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a BBMRI_CZ (LM2010004).



RECAM (O)

Regionální centrum
aplikované molekulární
onkologie



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách

Programmed Cell Death in Cancer Cells

Ondroušková E., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Rezistence k indukci smrti je jedním z charakteristických znaků nádorové buňky, jež ovlivňuje od počátku jak samotný proces neoplastické transformace, tak i pozdější odpověď na onkologickou léčbu. Cílem tohoto přehledového článku je shrnout recentní informace o programované buněčné smrti zdravých i nádorových buněk a o nových možnostech protinádorové terapie zacílené na tyto signální dráhy. Podrobněji jsou popsány tři hlavní typy: apoptóza, programovaná nekróza a buněčná smrt spojená s autofagií. Především apoptóza hraje významnou roli nejen při neoplastické transformaci buňky, ale i jako jeden z faktorů určujících úspěšnost protinádorové terapie. V textu je podán přehled hlavních signálních drah a molekul podílejících se na regulaci apoptózy ve zdravých buňkách. Většina nádorových buněk nese mutace v proteinech přímo či nepřímo se účastnících indukce a exekuce buněčné smrti, jako jsou proteiny p53, členové rodiny Bcl-2, proteiny inhibující apoptózu (IAPs), receptory/ligandy smrti a další. U těchto významných regulátorů jsou popsány jejich nejčastější mutace či změny exprese vyskytující se v buňkách konkrétních typů nádorů. Na závěr je podán přehled některých nových léčiv zaměřených na modulaci programované buněčné smrti, jež právě procházejí klinickými zkouškami. Díky intenzivnímu výzkumu je možné stále detailnější porozumění procesům, které v umírající buňce probíhají, a na jejich základě pak lze navrhovat léčiva nové generace, jež v kombinaci s tradiční terapií umožní významné zlepšení odpovědi na protinádorovou terapii.

Klíčová slova

programovaná buněčná smrt – apoptóza – nekroptóza – autofagie – kaspázy – Bcl-2

Summary

Resistance to programmed cell death is one of the hallmarks of cancer cells that affects the process of malignant transformation as well as response to cancer therapy. The goal of this review is to summarize recent information about programmed cell death (PCD) in healthy and cancer cells, as well as new perspectives for anticancer treatments targeting these signaling pathways. Three main types of PCD are described in detail: apoptosis, necrosis/necroptosis and cell death associated with autophagy. Among them, apoptosis plays the key role in both malignant transformation and response to therapy. In this review, we describe main signaling pathways and molecules participating in apoptosis regulation in healthy cells. In most cancer cells, mutations or aberrant expression of proteins directly or indirectly involved in induction and execution of cell death can be detected – p53, Bcl-2 family proteins, inhibitors of apoptosis, death receptors/ligands and other proteins. Mutations or changes in expression of these proteins and their relation to certain types of tumors are described. Finally, we provide a review of recently developed treatments that target and reactivate the machinery of programmed cell death and are currently tested in clinical trials.

Key words

programmed cell death – apoptosis – necroptosis – autophagy – caspases – Bcl-2

Práce byla podpořena grantem Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Eva Ondroušková, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: eva.ondrouskova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 14. 1. 2014

Přijato/Accepted: 6. 3. 2014

Úvod

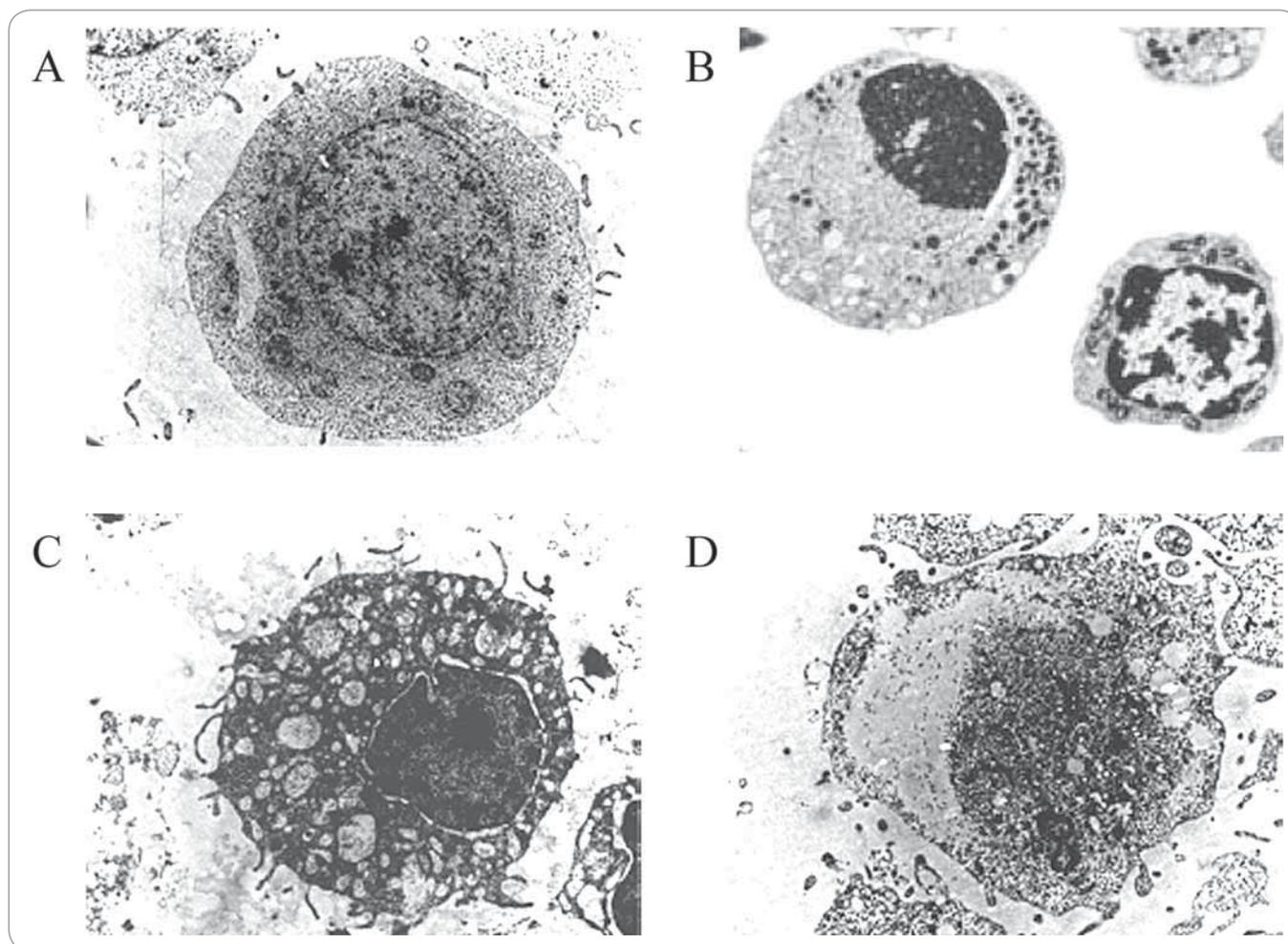
Proces postupné přeměny normální buňky v nádorovou ústí ve fatální změnu jejích vlastností souvisejících především s regulací růstu, schopností přežít a šířit se v organismu. Tyto základní vlastnosti maligních buněk jsou popsány v respektovaném článku Hanahana a Weinberga [1]. Mezi nejdůležitější charakteristické znaky nádorové buňky tito autoři zařadili i její schopnost uniknout indukci programované buněčné smrti. Nádorové buňky produkují řadu signálů, které za normálních okolností aktivují signální dráhy vedoucí k eliminaci těchto buněk – obsahují poškozenou DNA, aktivované onkogeny, jsou vystaveny oxidačnímu stresu atd. Ty z nich, které získají mutace umožňující zablokovat proces

jejich odstranění programovanou buněčnou smrtí, vytváří rezistentní klony a v organismu dále přežívají a neregulovaně se množí.

Převládající paradigma nádorové terapie předpokládá, že buňky, které jsou citlivé k indukci apoptózy, budou na léčbu odpovídat lépe než ty, jež jsou k indukci apoptózy a tím i k léčbě rezistentní. Základní výzkum, jenž odhaluje signální dráhy a mechanismy klasické apoptózy i alternativních typů buněčné smrti, poskytuje znalosti, na základě kterých lze vyvíjet nová léčiva a kombinovat je s tradiční protinádorovou terapií. Tato nová léčiva jsou většinou zaměřena na reaktivaci apoptotické dráhy a zvyšují tak úspěšnost eliminace nádorových buněk, jež by jinak byly k indukci smrti více rezistentní.

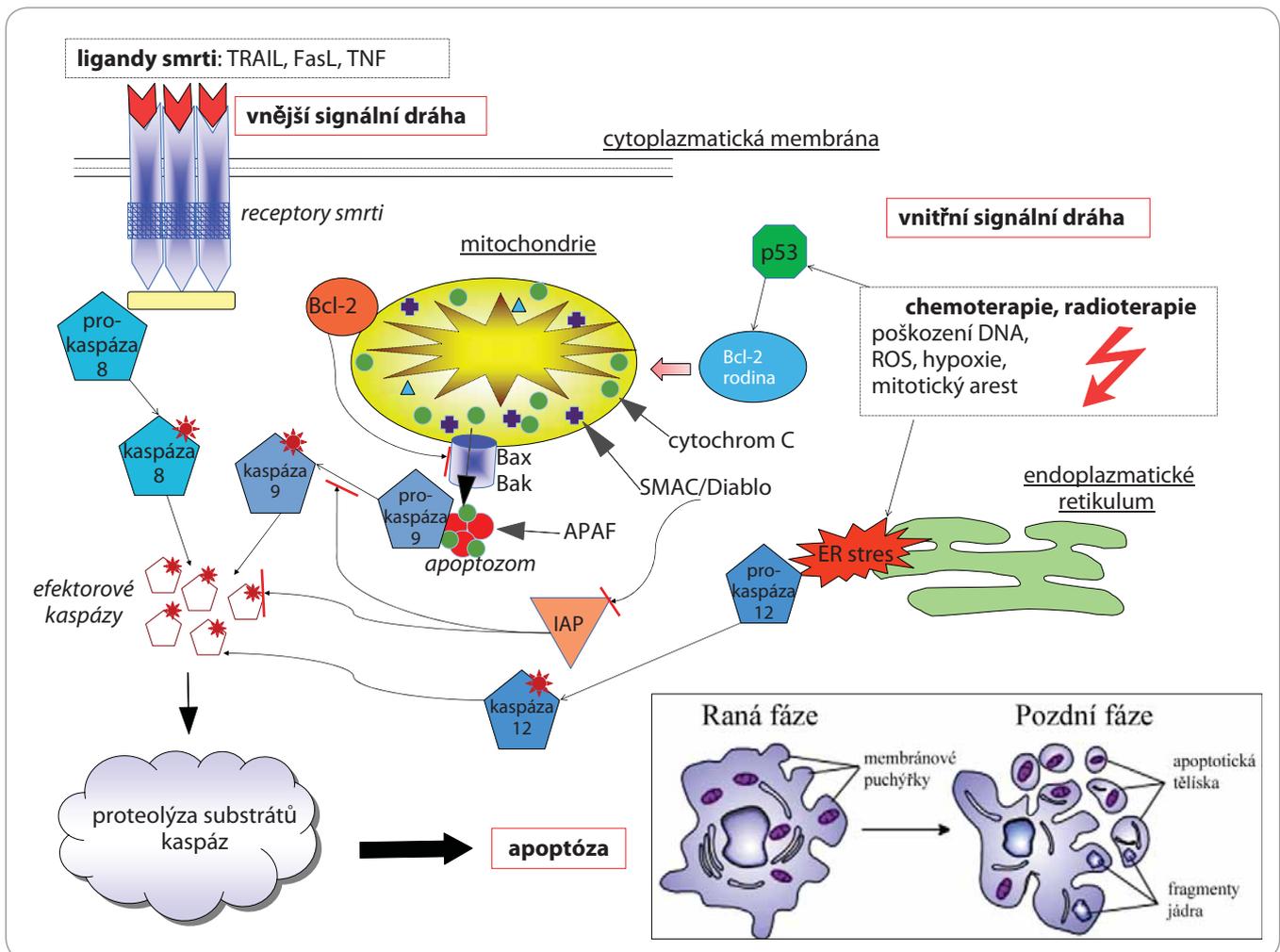
Typy programované buněčné smrti

Podle toho, jaké morfologické a jiné znaky umírající buňka vykazuje, lze programovanou buněčnou smrt (programmed cell death – PCD) klasifikovat do některého ze základních typů [2]. Morfologie buňky může být apoptotická, nekrotická, autofagická či spojená s mitózou. Historicky nejstarší typ identifikované PCD je apoptóza, popsaná již před více než 40 lety [3]. Nekroptóza a buněčná smrt asociovaná s autofagií jsou další dva typy PCD popsané u nejrůznějších typů buněk. Typická morfologie normální, apoptotické, autofagické a nekrotické buňky, nasnímaná na elektronovém mikroskopu, je na obr. 1. Pro úplnost: čtvrtý oficiálně uznávaný, ač vy-



Obr. 1. Buňka s normální, apoptotickou, autofagickou a nekrotickou morfologií.

Nasnímano elektronovým mikroskopem, zvětšení 4 400 \times , upraveno dle [91]. U zdravé buňky pozorujeme obvyklý tvar jádra i celé buňky (A), u apoptotické chromatin kondenzovaný v jádře a zmenšení objemu buňky (B), u autofagické výrazně vakuolizovanou cytoplazmu a jádro bez kondenzovaného chromatinu (C) a u nekrotické ztrátu integrity membrány a buněčného obsahu (D).



Obr. 2. Vnější a vnitřní signální dráha při apoptotické signalizaci.

Podrobnosti viz text. Upraveno dle [92,93].

soce specifický typ programované buněčné smrti je tzv. kornifikace neboli tvorba zrohovatělé vrstvy kůže z mrtvých keratinocytů v pevném proteinovém obalu [4]. Další typy buněčné smrti, které jsou v literatuře často uváděny (anoikis, excitotoxicita, Wallerova degradace, mitotická katastrofa, paraptóza, pyroptóza, entóza a pyronekróza), se zatím nedoporučuje klasifikovat jako samostatné druhy programované buněčné smrti [2].

Kromě morfologických znaků jsou dalším kritériem funkční aspekty, kterými rozlišujeme buněčnou smrt fyziologickou, patologickou, náhodnou či programovanou. Enzymologicky pak lze určit, do jaké míry jsou aktivovány nukleázy a proteázy různých tříd. Aktivace různých typů buněčné smrti se v jednot-

livých buňkách vzájemně nevyklučuje, naopak mohou spolupracovat či sdílet některé signální molekuly [5]. Jsou-li např. makrofágy ve tkáních vystaveny různým stresorům, je většinou současně indukováno více typů buněčné smrti, přičemž apoptóza probíhá nejrychleji, zatímco autofagie nebo nekróza jsou obvykle pozorovatelné až v případech, kdy je apoptóza inhibována [6].

Apoptóza

Termín „apoptosis“ jako první použil J. F. Kerr při objevu a popsání regulované buněčné smrti [3]. Buňka umírající apoptózou vykazuje charakteristické morfologické změny, které ji odlišují od nekrózy – kondenzace a fragmentace chromatinu v jádře, tvorba výběžků cytoplazmatické membrány (membránové

puchýřky), celkové zmenšení a zakulacení buňky a v pozdních fázích rozpad celé buňky do tzv. apoptotických tělísek [2]. Tato tělíska obsahují stále funkční organely, fragmenty kondenzovaného jádra a udržují si intaktní membránu, která se od membrány zdravých buněk liší přítomností fosfatidylserinu na její vnější straně [7]. To umožňuje rozpoznání a následné pohlčení apoptotických tělísek sousedními buňkami či buňkami imunitního systému [8]. Z biochemického hlediska jsou v umírající buňce typicky aktivovány proteolytické enzymy – kaspázy, které štěpí řadu cílových proteinů, a nukleázy, degradující DNA.

Aby buňka mohla zahájit proces své vlastní eliminace, musí obdržet odpovídající signály. Na obr. 2 jsou zjednodušeně znázorněny dvě hlavní signální

kaskády vedoucí k apoptóze v savčích buňkách. Vnější dráha je aktivována vazbou ligandů smrti (TRAIL, FasL, TNF) na receptory smrti (DR4/DR5, Fas, TNFR a další), které tvoří trimery, a přes další adaptorové proteiny aktivují prokaspázu-8, případně prokaspázu-10 [9,10]. Vnitřní dráha je odpovědná za iniciaci apoptózy v případě neopravitelného poškození DNA. Je to tedy dráha aktivovaná obvykle při onkologické terapii, a proto bude popsána detailněji. Do její regulace se zapojuje celá řada pro- i anti-apoptotických proteinů. Poškození DNA vede ke stabilizaci a aktivaci proteinu p53, který apoptotický signál dále přenáší především prostřednictvím regulace proteinů rodiny Bcl-2 [11]. Role proteinu p53 v regulaci apoptotické dráhy je komplexnější a pro podrobnější studium odkazujeme na přehledové články jiných autorů [12,13].

Zásadní událostí v klasické apoptotické signalizaci je částečná permeabilizace mitochondriální membrány, jež vede k uvolnění pro-apoptotických molekul z mezimembránového mitochondriálního prostoru do cytozolu. Do procesu uvolňování těchto proteinů z mitochondrií významně zasahují další proteiny přítomné v membráně mitochondrií nebo v cytoplasmě, především ty z rodiny Bcl-2 [14,15]. Tato rodina, do které bylo doposud zařazeno 25 proteinů, je charakterizována přítomností BH-domén (Bcl-2 homology) v jejich struktuře. Podle jejich funkce se rozlišují na anti-apoptotické (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, A1), pro-apoptotické efektorové (Bak, Bax), pro-apoptotické přímé aktivátory (Bid, Bim) či nepřímé aktivátory (Bad, Bik, BMF, HRK, Puma, Noxa) [16]. Aktivátory Bid a Bim po přijetí apoptotického signálu indukují oligomerizaci Bak a Bax, což vede k jejich translokaci z cytoplazmy do membrány mitochondrií a k vytvoření pórů ve vnější mitochondriální membráně. Pro-apoptotické a anti-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2 mohou tvořit dimery pomocí BH-3 domény, a tím se navzájem inaktivovat [17,18]. Vzájemný poměr a interakce pro- a anti-apoptotických členů rodiny Bcl-2 tedy rozhoduje o tom, zda bude apoptotická dráha inhibována či posilována. Cytochrom c,

uvolněný z mezimembránového prostoru mitochondrií, se v cytoplasmě spojuje s proteinem Apaf-1 a prokaspázou-9 a v tomto komplexu zvaném apoptozom je prokaspáza-9 štěpena na aktivní kaspázu-9 [19,20]. Z mitochondrií jsou dále uvolňovány proteiny SMAC/DIABLO, ARTS či proteáza Omi/HtrA2, které vážou a inaktivují anti-apoptotické proteiny IAPs přítomné v cytoplasmě (inhibitor of apoptosis; NAIP, c-IAP1/HIAP-2, c-IAP2/HIAP-1, XIAP/hILP, Survivin and BRUCE) [21–23]. Proteiny AIF (apoptosis-inducing factor) a endonukleáza G, rovněž uvolňované z mitochondrií, mohou realizovat program buněčné smrti i v nepřítomnosti kaspáz [24]. Další organela, která může zasahovat do regulace apoptotické signální dráhy, je endoplazmatické retikulum, jež jako odpověď na stres aktivuje prokaspázu-12 [25]. Rovněž lyzozomy se mohou účastnit regulace PCD, protože některé stimuly buněčné smrti vedou k částečné permeabilizaci lyzozomální membrány, uvolnění proteolytických enzymů do cytozolu a jejich aktivnímu přispění k aktivaci kaspáz [26,27].

Aktivované signální kaspázy-8, -9, -10 a -12 dále aktivují tzv. efektorové kaspázy zajišťující inaktivační či aktivační štěpení řady proteinů, jako jsou regulátory apoptózy, proteiny související s buněčnou adhezí, cytoskeletem, strukturou jádra, buněčným cyklem, opravou a syntézou DNA atd. [28], což nakonec vyústí v úspěšnou eliminaci buňky poškozené nebo z jiných důvodů určené k likvidaci.

Buněčná smrt spojená s autofagií

Autofagie je vysoce konzervativní mechanismus pro degradaci větších objemů buněčného materiálu, včetně celých organel. Poprvé byla popsána Christianem de Duve, který zavedl pojem „*autophagy*“ jako výstižný popis schopnosti buňky strávit a znovu využít své vlastní části (z řečtiny „*autos*“ = sebe, „*phagein*“ = požídat) [29]. Rozlišujeme makroautofagii, mikroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperony [30]. Při makroautofagii (dále jen „autofagie“) jsou organely, dlouho-žijící proteiny nebo agregáty uzavírány do dvoumembránových útvarů zvaných autofago-

zomy, které následně fúzí s lyzozomy, a jejich obsah je v nich lyzozomálními proteázami degradován [31]. Katabolické produkty jsou pak buňkou znovu recyklovány v biosyntetických procesech, nebo dále degradovány a využity jako zdroj energie v případě, že buňka hladoví. Celý proces je regulován skupinou genů označovaných *ATG* (*autophagy-related genes*) a je detailně popsán např. v přehledovém článku Rosenfeldta a Ryana [32].

Autofagie je především mechanismus, který buňce umožňuje přežití stresových podmínek, jakými jsou nedostatek živin nebo indukce nekrotické smrti v rakovinných buňkách či při ischemicko-reperfúzním poškození tkání [33]. Její role v nádorových buňkách je nejasná a zřejmě závisí na stadiu nádorového onemocnění. Zatímco v raných fázích autofagie spíše suprimuje vývoj nádoru, protože odstraňuje poškozené organely a proteiny s nesprávnou, potenciálně škodlivou konformací [34], v pozdějších stadiích naopak zřejmě pomáhá rakovinným buňkám vyrovnat se se stresovými podmínkami, jako je nedostatek živin či oxidativní stres [35]. Tzv. autofagická buněčná smrt je charakterizována výrazným nárůstem počtu autofagických vakuol v buňce, bez kondenzace jaderného chromatinu, ukončená její smrtí [36]. Ačkoliv je akumulace autofagických vakuol v cytoplasmě často pozorována u buněk umírajících po aplikaci chemoterapie nebo radioterapie, není zcela prokázáno, zda je autofagie v těchto případech příčinou smrti, anebo jen doprovodným jevem [2]. Přímý důkaz, že autofagie může skutečně vést ke smrti konkrétních buněk *in vivo*, byl zatím podán pouze při vývoji slinných žláz *Drosophily*, ve kterých zablokování genů nezbytných pro autofagii vedlo k inhibici vývojové degradace těchto buněk [37]. I pokud by ale autofagie nebyla přímým vykonavatelem buněčné smrti, vzhledem k časté detekci autofagických vakuol v umírajících buňkách zřejmě hraje v tomto procesu důležitou roli, a proto je i nadále nadějným cílem pro vývoj nových léčiv.

Nekroptóza

Za pasivní formu buněčné smrti byla vždy považována nekroza. Ta je charak-

terizována rychlou a neregulovanou ztrátou integrity plazmatické membrány a buněčným kolapsem, ačkoliv integrita jádra zůstává poměrně dlouho zachována. V posledních letech se však objevily studie prokazující, že alespoň část buněk s nekrotickou morfologií umírá regulovaným procesem zvaným programovaná nekróza nebo také nekroptóza [38]. Nekrotická smrt je pro buňku nejen záložní postup v případech, kdy je apoptóza z nějakého důvodu zablokována, ale má i svůj fyziologický význam např. jako obranný mechanismus při virových infekcích. Z hlediska vlivu na nádorové buňky je nekrotická buněčná smrt dvousečnou zbraní. Nekróza vznikající jakožto důsledek chemoterapie přispívá k usmrcování nádorových buněk s defekty v apoptotické dráze. Na druhou stranu lokální zánětlivé procesy způsobené vyplavením obsahu nekrotických buněk např. z hypoxických oblastí nádoru spíše podporují angiogenezi a proliferaci nádorových buněk.

Nekroptózu můžou v buňkách aktivovat různé stimuly: IFN γ , nedostatek ATP, přítomnost patogenů, ischemicko-reperfúzní poškození tkání, dvouřetězcová RNA (dsRNA) a vazba tzv. ligandů smrti (TNF α , TRAIL, FasL) na příslušný receptor [39]. Za normálních okolností tato vazba receptoru a ligandu vede k sestavení proteinového komplexu obsahujícího kaspázu-8, adaptorový protein FADD a kinázu RIP1 (receptor-interacting serine-threonine kinase 1) a následně ke spuštění apoptózy prostřednictvím signální kaskády zahrnující aktivovanou kaspázu-8 [40]. Jestliže jsou však kaspázy z nějakého důvodu inaktivní, je do tohoto proteinového komplexu zahrnuta i kináza RIP3. Kinázy RIP1 a RIP3 vzájemně interagují pomocí RIP-homotypické interakční domény. K této interakci dochází pouze v případě aktivace nekroptotické signální dráhy, jež může být blokována specifickým inhibitorem RIP1-kinázové aktivity – nekrostatinem [41]. Protein RIP1 je spíše znám svou účastí při aktivaci proteinu NF- κ B [42], a je tedy zřejmě důležitý účastník rozhodování, zda buňka přežije díky aktivaci NF- κ B nebo zda bude eliminována apoptotickým, resp. nekroptotickým mechanismem. Síť pro-

teinů zasahujících do regulace programované nekrózy se díky novým poznatkům stále rozrůstá a zahrnuje dále např. PARP1, PAR polymery, NADPH oxidázy a kalpainy [43].

Pro-nekrotický komplex RIP1–RIP3 následně interaguje s metabolickými enzymy a zvyšuje uhlovodíkový a glutaminový metabolismus, což je doprovázeno zvýšením množství reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS) [44]. Právě ROS se zřejmě u většiny buněčných typů významně podílí na exekuční fázi nekrotického usmrcení buňky [45]. Biochemických změn probíhajících v nekrotické buňce je ale celá řada a většina z nich je fatální. Proto zatím nelze přesně říci, které z nich jsou pro osud buňky nejvíce zásadní a určující [46].

Mutace regulátorů programované buněčné smrti v nádorových buňkách

Úspěch chemoterapeutické léčby, která je často zacílena na DNA, je z podstatné části ovlivněn schopností buněk opravovat poškozenou DNA a také aktivovat eliminační apoptotický proces. V nádorových buňkách je mutována celá řada proteinů, jež přímo či nepřímo ovlivňují rezistenci buněk k indukci buněčné smrti. Pro jejich podrobný popis však není v tomto přehledovém článku dost prostoru. Jsou to např. proteiny p53, Ras, Raf, Src, NF- κ B, HSPs a mnoho dalších.

V nádorových buňkách byly detekovány mutace proteinů, které jsou přímou součástí jak vnější apoptotické signální dráhy (vzácněji), tak vnitřní signální kaskády od mitochondriálních regulátorů po kaspázy. Jejich detailnějšímu popisu se budeme dále věnovat.

Receptory smrti

Buněčná smrt indukovaná Fas receptorem může být inhibována tvorbou rozpustného Fas, nedostatečnou expresí Fas na povrchu buňky, nadměrnou expresí inhibičních proteinů (Fas-associated phosphatase-1 nebo FLIP) či mutací v primární struktuře Fas [47–49]. Mutace ve Fas receptoru byly poprvé popsány u mnohčetného myelomu [50] a jsou detekovány v různých typech lymfomů [51].

TRAILem indukovaná apoptóza může být blokována expresí tzv. decoy recep-

torů pro TRAIL, nadměrnou expresí inhibičních proteinů (FLIP) nebo mutací v primární struktuře DR4 a DR5 [52]. Mutace TRAIL-R1 a TRAIL-R2 receptorů byly detekovány např. u metastáz prsních karcinomů, nemalobuněčných prsních karcinomů či nádorů hlavy a krku [53–55].

Rodina Bcl-2

Bcl-2 protein byl původně objeven v buňkách B-lymfomu, v nichž je v důsledku chromozomální translokace t(14;18) jeho gen fúzován se silným promotorem imunoglobulinu. Díky tomu je jeho hladina výrazně zvýšena [56]. Zvýšená hladina Bcl-2 byla pozorována i v solidních nádorech, jako jsou nádory plic, prsu a mozku. Důvodem zvýšené transkripce jsou pravděpodobně hypometylace promotoru či ztráta příslušných miRNA, které negativně regulují expresi *bcl-2* [57].

Vysoká hladina exprese proteinu Bcl-XL byla zjištěna v buňkách mnohčetných myelomů a lymfomů [58]. Zvýšený počet kopií genů *bcl-xl* a *mcl-1* byl dále detekován v řadě jiných nádorů, např. plic a kostí [59].

Také pro-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2 mohou zastávat funkci nádorových supresorů. Jejich snížené hladiny v důsledku mutací (Bim, Puma) či epigenetických modifikací (Puma) byly totiž popsány u B-lymfomů nebo Burkittova lymfomu [59–61]. Mutovaný Bax byl zachycen např. u nádorů gastrointestinálního traktu a v leukemiích [62,63].

Apaf-1

Snížená hladina Apaf-1, detekovaná v metastatických melanomech, je spíše důsledek epigenetického umlčení exprese *apaf-1* než mutace v jeho kódující sekvenci [64]. Snížená hladina Apaf-1 je znak špatné prognózy u pacientů s B typem chronické lymfocytické leukemie, pokud se vyskytuje současně s mutací v proteinu p53 [65].

IAPs

Chromozomální region 11q21–22, kódující *CIAP1* a *CIAP2*, je amplifikován v mnoha typech nádorových tkání – hepatocelulárním karcinomu, karcinomu prsu, meduloblastomu, a v karcinomech slinivky, plic, děložního hrdla či

Tab. 1. Přehled potenciálních léčiv, zaměřených na regulátory apoptózy, jež v současné době procházejí klinickými zkouškami.

Cílová molekula	Název preparátu	Princip účinku	Typy testovaných nádorů (www.clinicaltrials.gov)	Klinické zkoušky	Literatura
TRAIL receptory	Mapatumumab (HGS-ETR1)	agonistická TRAIL-R1 protilátka	non-Hodgkinův lymfom, hepatocelulární karcinom, nemalobuněčný typ karcinomu plic (NSCLC), mnohočetný myelom, karcinom děložního hrdla	fáze 2	[76]
	Lexatumumab (HGS-ETR2)	agonistická TRAIL-R2 protilátka	solidní nádory dětí	fáze 1	[77]
	Apomab	agonistická TRAIL-R2 protilátka	non-Hodgkinův lymfom (australiancancertrials.gov.au)	fáze 2	[78]
	Dulanermin (PRO1762)	agonistický fragment proteinu Apo2L/TRAIL	non-Hodgkinův lymfom, kolorektální karcinom	fáze 2	[79]
kaspáza-3	Immunocasp 3	HER2 protilátka fúzovaná s kaspázou-3	buněčná linie lidského lymfomu	preklinické	[80]
	Ad-G/iCasp3	adenovirus s chemicky inducibilní kaspázou-3	buněčné linie nádoru prostaty	preklinické	[81]
IAP	LY2181308	antisense oligonukleotid proti Survivinu	akutní myeloidní leukemie, NSCLC, nádory prostaty	fáze 1	[82]
	AEG35156	antisense oligonukleotid proti XIAP	hepatocelulární karcinom, solidní nádory dospělých, myelomonocytická akutní leukemie	fáze 1, 2	[83]
	AEG40826	malomolekulární pan-IAP inhibitor	solidní nádory dospělých	fáze 1	[84]
	LCL161	malomolekulární pan-IAP inhibitor	solidní nádory dospělých	fáze 1	[85]
	Birinapant	malomolekulární pan-IAP inhibitor	myelodysplastický syndrom, nádory vaječníků	fáze 1	[84]
Bcl-2 rodina	Oblimersen (Genasense)	antisense oligonukleotid proti Bcl-2	akutní myeloidní leukemie, SCLC, chronická lymfocytická leukemie, nádory mléčné žlázy, non-Hodgkinův lymfom a další	fáze 3	[86]
	Obatoclox	malomolekulární inhibitor anti-apoptotických členů rodiny Bcl-2	leukemie (mastocytóza), lymfomy, SCLC	fáze 2	[87]
	Gossypol	malomolekulární inhibitor anti-apoptotických členů rodiny Bcl-2	SCLC, glioblastom, nádory prostaty, mozku, lymfomy	fáze 2	[88]
	Navitoclax	BH3-mimetika, uvolnění pro-apoptotických BH3 proteinů	SCLC, lymfomy, solidní nádory dospělých	fáze 2	[89]
autofagie	Chloroquine + deriváty	inhibuje lyzozomální enzymy a tím i autofagii	nádory slinivky břišní, mozku, mléčné žlázy, mnohočetný myelom a další	fáze 1, 2	[90]

jícnu [66]. Asi u 30 % MALT lymfomů je detekována chromozomální translokace t(11;18) (q21;q21), díky které vzniká chimerický protein N-terminální sekvence cIAP2 spojené s C-terminální sekvencí MALT1 [67]. V lymfocytech mohou IAP proteiny zřejmě naopak působit protinádorově. Mutace v jejich kódujících

sekvencích byly totiž zachyceny v mnohočetných myelomech [68] nebo lymfoproliferativních onemocněních [69].

Kaspázy

Z prozatím testovaných typů nádorových onemocnění byly mutace kaspázy-8 (v kódující sekvenci, intronech

a 3' nepřekládané oblasti) nejčastěji zachyceny v pokročilých stádiích nádorů žaludku [70]. Snížená exprese v důsledku hypermetylace promotoru byla popsána u relabujících glioblastomů, což naznačuje, že kaspáza-8 může mít vliv na vývoj tohoto typu nádorů [71]. Inaktivační mutace kaspáz-3 a -7 byly pouze sporadicky

zachyceny u solidních nádorů různých typů [72,73]. Polymorfismus v regionu regulace transkripce kaspázy-3 byl popsán v buňkách karcinomu skvamózních buněk hlavy a krku [74]. V myších se zablokovanou tvorbou kaspáz nebyla detekována zvýšená incidence nádorových onemocnění. Tyto výsledky tedy nasvědčují spíše tomu, že mutace jednotlivých kaspáz nepatří mezi hlavní příčiny neoplastické transformace buněk [75].

Přehled testovaných léčiv založených na reaktivaci programované buněčné smrti

Při onkologické terapii jsou nejčastějším cílem léčiv proliferativní mechanismy a onkogenní signály podporující přežívání nádorových buněk. Vývoj novějších léků je mimo jiné zaměřen na reaktivaci apoptotických signálních drah, a to jak vnější, tak především vnitřní, jež by mohly vést k úspěšné regresi nádoru. Hlavní cílové molekuly vytipované pro léčbu, princip účinku preparátu a fáze klinických zkoušek, ve kterých jsou nejnadějnější preparáty testovány, jsou shrnuty v tab. 1.

Závěr

Nádorová onemocnění jsou dlouhodobě druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR po nemocech srdce a cév. I přes narůstající incidenci se u nás daří stabilizovat mortalitu díky časnějšímu zachytu onemocnění a také díky novým léčebným metodám. Poznatky základního výzkumu na molekulární a buněčné úrovni přináší nové možnosti přesného a efektivního zacílení léčby, mimo jiné i na proteiny apoptotické signální dráhy, jejíž reaktivace by mohla vést ke zlepšení odpovědi na protinádorovou terapii.

Literatura

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P et al. Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16(1): 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239–257.
- Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(4): 328–340.
- Rubinstein AD, Kimchi A. Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 22): 5259–5268. doi: 10.1242/jcs.115865.
- Martinet W, Schrijvers DM, Herman AG et al. Z-VAD-fmk induced non-apoptotic cell death of macrophages. *Autophagy* 2006; 2(4): 312–314.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013–2026.
- Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998; 5(7): 551–562.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381): 1305–1308.
- Wachman K, Pop C, van Raam BJ et al. Activation and specificity of human caspase-10. *Biochemistry* 2010; 49(38): 8307–8315. doi: 10.1021/bi100968m.
- Michalak EM, Villunger A, Adams JM et al. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ* 2008; 15(6): 1019–1029. doi: 10.1038/cdd.2008.16.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol* 2011; 223(2): 116–126. doi: 10.1002/path.2784.
- Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ et al. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med* 2010; 9(45): 145–152.
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003; 7(3): 249–257.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004; 303(5660): 1010–1014.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Lambi F et al. The Bcl-2 family reunion. *Molecular Cell* 2010; 37(3): 299–310. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.025.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(17): 7834–7838.
- Vela L, Gonzalo O, Naval J et al. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J Biol Chem* 2013; 288(7): 4935–4946. doi: 10.1074/jbc.M112.422204.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR et al. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275(5303): 1132–1136.
- Zou H, Henzel WJ, Liu A et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90(3): 405–413.
- Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13(3): 239–252.
- Du C, Fang M, Li Y et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102(1): 33–42.
- Gottfried Y, Rotem A, Lotan R et al. The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP. *EMBO J* 2004; 23(7): 1627–1635.
- Schafer P, Scholz SR, Gimadutdinov O et al. Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J Mol Biol* 2004; 338(2): 217–228.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403(6765): 98–103.
- Beneš P, Větvíčka V, Fusek M. Cathepsin D – many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 68(1): 12–28. doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.02.008.
- Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004; 23(16): 2881–2890.
- Fisher U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10(1): 76–100.
- de Duve CH, Wattiaux R. Functions of lysosome. *Annu Rev Physiol* 1966; 28: 435–492.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; 147(4): 728–741. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 814–822. doi: 10.1038/ncb0910-814.
- Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 2011; 32(7): 955–963. doi: 10.1093/carcin/bgr031.
- Esposito DD, Domart MC, Sebah M et al. Autophagy is induced by ischemic preconditioning in human livers formerly treated by chemotherapy to limit necrosis. *Autophagy* 2010; 6(1): 172–174.
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; 21(11): 1367–1381.
- Yang S, Wang X, Contino G et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 2011; 25(7): 717–729. doi: 10.1101/gad.2016111.
- Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2679–2688.
- Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* 2007; 131(6): 1137–1148.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005; 1(2): 112–119.
- Vanlangenakker N, Bertrand MJM, Bogaert P et al. TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death Dis* 2011; 2(11): e230. doi: 10.1038/cddis.2011.111.
- Scaffidi C, Kirchhoff S, Kramer PH et al. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(3): 277–285.
- Degterev A, Hitomi J, Germscheid M et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 2008; 4(5): 313–321. doi: 10.1038/nchembio.83.
- Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 2008; 132(3): 344–362. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012; 45(6): 478–498. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- Zhang DW, Shao J, Lin J et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009; 325(5938): 332–336. doi: 10.1126/science.1172308.
- Lin Y, Choksi S, Shen HM et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* 2004; 279(11): 10822–10828.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(10): 700–714. doi: 10.1038/nrm2970.
- Natoli G, Ianni A, Constanzo A et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. *Oncogene* 1995; 11(6): 1157–1164.
- Irmiler M, Thome M, Hahne M et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388(6638): 190–195.
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268(5215): 1347–1349.
- Landowsky TH, Qu N, Buyuksal I et al. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 1997; 90(11): 4266–4270.
- Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with

- extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998; 92(9): 3018–3024.
52. Bin L, Thorburn J, Thomas LR et al. Tumor-derived mutations in the TRAIL receptor DR5 inhibit TRAIL signaling through the DR4 receptor by competing for ligand binding. *J Biol Chem* 2007; 282(38): 28189–28194.
53. Lee SH, Shin MS, Kim HS et al. Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 1999; 59(22): 5683–5686.
54. Shin MS, Kim HS, Lee SH et al. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61(13): 4942–4946.
55. Fisher MJ, Virmani LW, Aplenc R et al. Nucleotide substitution in the ectodomain of TRAIL receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res*; 7(6): 1688–1697.
56. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J et al. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229(4720): 1390–1393.
57. Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2011; 18(9): 1414–1424. doi: 10.1038/cdd.2011.17.
58. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 1994; 54(21): 5501–5507.
59. Beroukhi R, Mermel C, Porter D et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010; 463(7283): 899–905. doi: 10.1038/nature08822.
60. Tagawa H, Karnan S, Suzuki R et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 2005; 24(8): 1348–1358.
61. Garrison SP, Jeffers JR, Yang C et al. Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 2008; 28(17): 5391–5402. doi: 10.1128/MCB.00907-07.
62. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275(5302): 967–969.
63. Meijerink JP, Smetsers TF, Sloetjens AW et al. Bax mutations in cell lines derived from hematological malignancies. *Leukemia* 1995; 9(11): 1828–1832.
64. Soengas MS, Capoieci P, Polsky D et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409(6817): 207–211.
65. Sturm I, Bosanquet AG, Radetzki S et al. Silencing of Apaf-1 in B-CLL results in poor prognosis in the case of concomitant p53 mutation. *Int J Cancer* 2006; 118(9): 2329–2336.
66. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as target for drug development in oncology. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 1285–1304.
67. Garrison JB, Samuel T, Reed JC. TRAF2-binding BIR1 domain of c-IAP2/MALT1 fusion protein is essential for activation of NF-kappaB. *Oncogene* 2009; 28(13): 1584–1593. doi: 10.1038/nc.2009.17.
68. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12(2): 115–130.
69. Filipovich AH, Zhang K, Snow AL et al. X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood* 2010; 116(18): 3398–3408. doi: 10.1182/blood-2010-03-275909.
70. Soung YH, Lee JW, Kim SY et al. Caspase-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(3): 815–821.
71. Martinez R, Setien F, Voelter C et al. CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. *Carcinogenesis* 2007; 28(6): 1264–1268.
72. Soung YH, Lee JW, Kim SY et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet* 2004; 115(2): 112–115.
73. Soung YH, Lee JW, Kim HS et al. Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene* 2003; 22(39): 8048–8052.
74. Chen K, Zhao H, Hu Z et al. CASP3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19): 6343–6349. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1198.
75. Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 2011; 18(9): 1441–1449. doi: 10.1038/cdd.2011.30.
76. Greco FA, Bonomi P, Crawford J et al. Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1 in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 61(1): 82–90. doi: 10.1016/j.lungcan.2007.12.011.
77. Zhang I, Zhang X, Barrisford GE et al. Lexatumumab (TRAIL-receptor 2 mAb) induces expression of DR5 and promotes apoptosis in primary and metastatic renal cell carcinoma in a mouse orthotopic model. *Cancer Lett* 2007; 251(1): 146–157.
78. Zinonos I, Labrinidis A, Lee M et al. Apomab, a fully human agonistic antibody to DR5, exhibits potent antitumor activity against primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(10): 2969–2980. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0745.
79. Soria JC, Mark Z, Zatloukal P et al. Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(33): 4442–4451. doi: 10.1200/JCO.2011.37.2623.
80. Jia LT, Zhang LH, Yu CJ et al. Specific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active caspase-3. *Cancer Res* 2003; 63(12): 3257–3262.
81. Shariat SF, Desai S, Song W et al. Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: a novel „death switch“ gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61(6): 2562–2571.
82. Tanioka M, Nokihara H, Yamamoto N et al. Phase I study of LY2181308, an antisense oligonucleotide against survivin, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68(2): 505–511. doi: 10.1007/s00280-010-1506-7.
83. Schimmer AD, Estey EH, Borthakur G et al. Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2009; 27(28): 4741–4746. doi: 10.1200/JCO.2009.21.8172.
84. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-κB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(8): 561–574. doi: 10.1038/nrc2889.
85. Qin Q, Zuo Y, Yang X et al. Smac mimetic compound LCL161 sensitizes esophageal carcinoma cells to radiotherapy by inhibiting the expression of inhibitor of apoptosis protein. *Tumor Biol* 2014; 35(3): 2565–2574. doi: 10.1007/s13277-013-1338-2.
86. O'Brien S, Moore JO, Boyd TE et al. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol* 2009; 27(31): 5208–5212. doi: 10.1200/JCO.2009.22.5748.
87. Goard CA, Schimmer AD. An evidence-based review of obatoclax mesylate in the treatment of hematological malignancies. *Core Evid* 2013; 8: 15–26. doi: 10.2147/CE.542568.
88. Baggstrom MQ, Qi Y, Koczywas M et al. A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6(10): 1757–1760. doi: 10.1097/JTO.0b013e31822e2941.
89. Rudin CM, Hann CL, Garon EB et al. Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18(11): 3163–3169. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3090.
90. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp* 2013; 61(1): 43–58. doi: 10.1007/s00005-012-0205-y.
91. Ondroušková E, Souček K, Horváth V et al. Alternative pathways of programmed cell death are activated in cells with defective caspase-dependent apoptosis. *Leuk Res* 2008; 32(4): 599–609.
92. Walker NI, Harmon BV, Gobé GC et al. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 1988; 13: 18–54.
93. Brown M, Wilson G. Apoptosis genes and resistance to cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(5): 477–490.

Využití průtokové cytometrie pro analýzu mitochondriální buněčné smrti

The Use of Flow Cytometry for Analysis of the Mitochondrial Cell Death

Pekarčíková L.¹, Knopfová L.¹, Ondroušková E.², Šmarda J.¹

¹ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

² Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Apoptóza je typ programované buněčné smrti (typ I), který je nezbytný pro správný vývoj organismu a tkáňovou homeostázu. Její průběh může být určen dvěma signálními drahami – vnější (receptorovou) dráhou řízenou receptory smrti a vnitřní (mitochondriální) apoptotickou dráhou, kde klíčovou roli plní mitochondrie. Mitochondrie jsou důležité buněčné orgány s nepostradatelnými funkcemi pro život buňky, jako je např. tvorba energie ve formě molekul ATP (adenosintrifosfátu). Mitochondriální buněčná smrt je charakteristická změnou transmembránového potenciálu a permeabilizací vnější mitochondriální membrány. Mitochondrie jsou elektronegativní orgány a depolarizace mitochondriální membrány je důležitá pro uvolnění proapoptických signálů. Narušená regulace mitochondriální buněčné smrti se může podílet na patogenezi různých onemocnění, včetně rakoviny. Mitochondrie jsou také zdrojem reaktivních kyslíkových radikálů, iontů Ca^{2+} a proteinů ovlivňujících procesy iniciace a progresu nádorů nezávisle na indukci apoptózy. Současné studie se zaměřují na výzkum mitochondriálního membránového potenciálu a kyslíkových radikálů, které modulují různé signální dráhy uvnitř buňky a vymezení jejich významu v karcinogenezi, případně v léčbě onkologických pacientů. Monitorování apoptotických markerů, jako je stav mitochondriálního membránového potenciálu a určení hladiny reaktivních kyslíkových radikálů ve vzorcích nádorových pacientů, má prediktivní hodnotu pro výstup léčebných protokolů.

Klíčová slova

mitochondrie – průtoková cytometrie – apoptóza – volné radikály – membránový potenciál mitochondrií

Summary

Apoptosis is type I programmed cell death, a process that is essential for development and tissue homeostasis. It is a prevalent form of cell death and it proceeds via two signaling pathways – external (receptor pathway) triggered by death receptors and intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway with major involvement of mitochondria. Mitochondria are important cellular organelles producing energy stored in molecules of adenosine triphosphate that are essential for cell survival. The mitochondrial cell death is characterized by permeabilization of the mitochondrial outer membrane and dissipation of the transmembrane potential. Mitochondria are electronegative organelles and depolarization of the mitochondrial membrane is important for the release of proapoptotic signals. Aberrant control of the mitochondrial cell death might contribute to several diseases including cancer. Mitochondria are also a source of reactive oxygen species, Ca^{2+} ions and other proteins that affect processes important for the initiation and progression of tumors independently of apoptosis. Current studies focus on research of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species modulating various signaling pathways within the cell, their importance in carcinogenesis, and in treatment of oncological patients. Monitoring of the apoptotic markers, such as the mitochondrial membrane potential (MMP), and the level of reactive oxygen species in samples of oncological patients has a predictive value for the output of treatment protocols.

Key words

mitochondria – flow cytometry – apoptosis – free radicals – mitochondrial membrane potential

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a IntegRECAMO, CZ.1.07/2.3.00/20.0097).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and IntegRECAMO CZ.1.07/2.3.00/20.0097).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
e-mail: smarda@sci.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 13. 1. 2014
Přijato/Accepted: 11. 4. 2014

Úvod

Nádorová onemocnění patří po kardio-vaskulárních chorobách k druhé nejčastější příčině úmrtí ve vyspělých zemích. V počtu onkologických pacientů zaujímá Česká republika přední místa v Evropě. Každý rok onemocní nádory v ČR přes 77 000 lidí (data za rok 2010). Statistika ukazuje, že v průběhu života každý třetí obyvatel v ČR onemocní rakovinou a každý čtvrtý na ni zemře [1,2].

Existuje mnoho typů rakoviny, ale nelze říci, že existuje jedna všeobecně použitelná léčba. Společné jsou ovšem principy léčby. Mezi nejčastější protinádorovou léčbu se řadí chirurgický zákrok, radioterapie a chemoterapie. Chemoterapie je léčba založená na podávání cytostatických látek, které jsou toxické pro rychle se dělící buňky. Zdravá buňka zasažená cytostatikem má na rozdíl od nádorové buňky díky svým nepoškozeným opravným mechanismům větší šanci na přežití. Některé typy nádorů nejsou ovšem k působení cytostatických látek z různých důvodů citlivé. Proto je důležité objasnit příčinu chemorezistence nádorových buněk, zaměřit se na správné signální dráhy a tím otevřít nové možnosti léčby rakoviny. Jednou z takových možností, které se mnohé studie věnují s cílem zvýšit protinádorovou aktivitu a selektivitu chemoterapeutických látek a překonat lékovou rezistenci nádorů, je kombinace tradiční chemoterapie s látkami zaměřenými na ovlivnění funkce mitochondrií [3]. Výzkum se zaměřuje na roli mitochondrií a mitochondriálního membránového potenciálu v buněčném přežívání/smrti. Ovlivněním mitochondrií dochází k permeabilizaci mitochondriální membrány s následným uvolněním superoxidových aniontů a molekul peroxidu vodíku a k indukci buněčné smrti u nádorových buněk rezistentních ke konvenční chemoterapii [4,5]. Studium souvislosti mezi účinností léčby a indukcí mitochondriální buněčné smrti je možné analýzou mitochondriálního membránového potenciálu a hladiny kyslíkových radikálů metodou průtokové cytometrie, která je rutinně využívána v diagnostice mnoha nemocí, ve výzkumu i klinické praxi. Význam průtokové cytometrie spočívá v tom, že umožňuje rychlou analýzu fyzikálních a biochemických parametrů ti-

síců buněk během několika sekund. Analýza mitochondriálního membránového potenciálu a reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS) může přispět k prohloubení vědomostí o mechanismech mitochondriální buněčné smrti a zlepšit strategie léčebných postupů u pacientů s nádorovým onemocněním.

Buněčná smrt

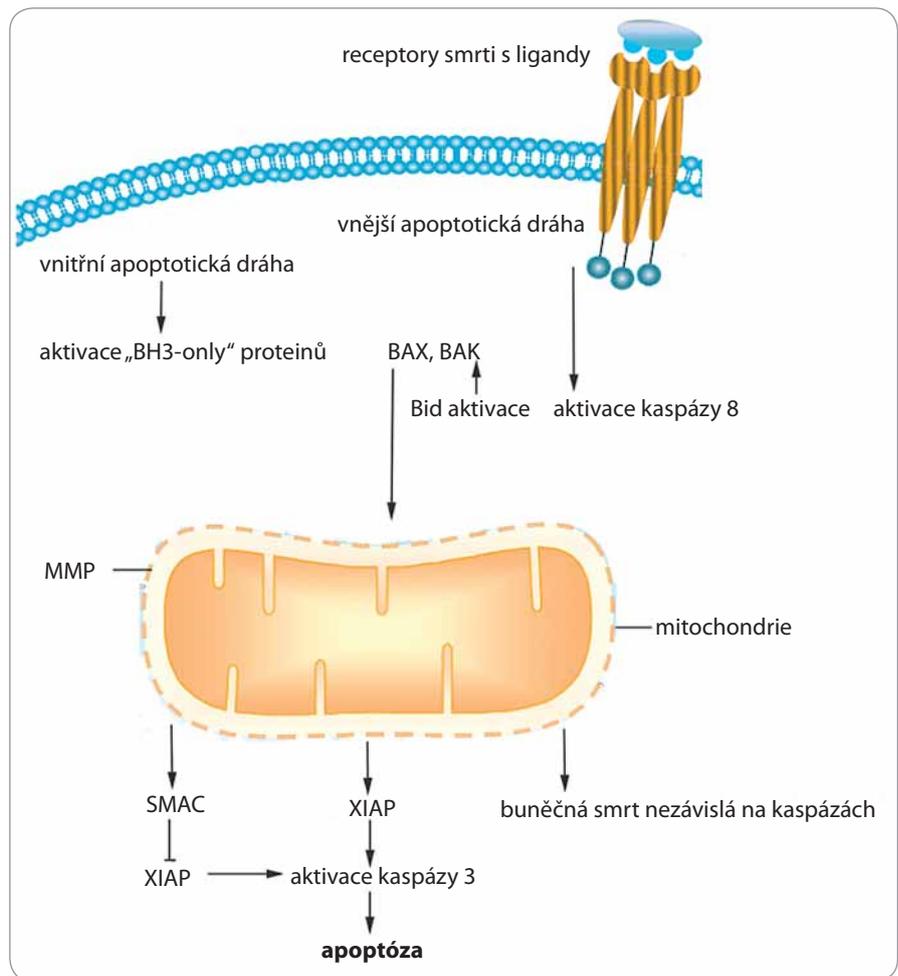
Buněčná smrt je fyziologický proces důležitý pro vývoj organismu, udržuje tkáňovou homeostázu kontrolou počtu buněk a defenzivní strategií odstraňuje buňky infikované, mutované nebo poškozené. V lidském těle jsou každou vteřinu mitózou produkovány nové buňky v řádu stovek tisíců a podobný počet buněk umírá fyziologickým procesem zvaným apoptóza [6,7]. Apoptóza je evolučně konzervativní u mnohobuněčných organismů a je striktně regulována genetickým programem. Může být iniciována nebo inhibována širokým spektrem environmentálních stimulů – fyziologických i patologických. Odehrává se ve dvou fázích. První je charakteristická tvorbou apoptotických tělísek. Druhá je jejich fagocytóza a degradace jinými buňkami [8]. Apoptotický proces vede k sérii charakteristických morfologických a biochemických změn. Genetickým programem dochází k aktivaci cysteinových aspartyl-proteáz – tzv. kaspáz, které hrají v apoptóze zásadní roli. Kaspázy jsou syntetizovány jako neaktivní polypeptidy (zymogeny), jež jsou proteolyticky štěpeny jinými proteázami a sestavovány do aktivních tetramerů. Kaspázy štěpí mnoho rozmanitých jaderných a cytoplazmatických substrátů, které vedou k rozkladu buňky [9,10]. Mezi charakteristické morfologické změny apoptotické buňky patří kondenzace chromatinu, fragmentace DNA, smrštění plazmatické membrány spojené s translokací fosfatidylserinu na vnější stranu plazmatické membrány a tvorba apoptotických tělísek následně fagocytovaných makrofágy [8,11,12]. Další skupinou proteinů významných pro apoptotickou signalizaci jsou proteiny rodiny Bcl2, jejichž zastupci apoptózu inhibují nebo podporují. Antiapoptotické proteiny, např.

Bcl2 a Bclxl, apoptózu iniciovanou širokým spektrem signálů (např. růstovými faktory, cytokiny, chemoterapeutiky, poškozením DNA, UV zářením) inhibují, zatímco proapoptotické proteiny, např. Bax a Bak, ji stimulují [13–15]. Mezi jiné biochemické události, které se účastní apoptotické signalizace, patří změny v mitochondriálním membránovém potenciálu, redistribucí a množství ROS, vápenatých iontů, množství cytochromu c, proapoptotických proteinů a inhibitorů antiapoptotických molekul v cytoplazmě. Deregulace apoptózy vede k imunodeficienci, nádorovým a autoimunitním onemocněním. Možnost modulace apoptotických procesů otevírá nové strategie léčebných postupů a zlepšení chemoterapie.

Mitochondrie a mitochondriální apoptotická dráha

Mitochondrie jsou tvořeny lipidovou dvojvrstvou – vnější a vnitřní mitochondriální membránou, což je dáno jejich endosymbiotickým původem [16]. Skládají se ze tří částí: mitochondriální matrix s DNA, mezimembránového prostoru a mitochondriálních krist. Kompartmentalizace mitochondrií je nezbytná pro správnou lokalizaci dějů, které se v nich odehrávají. Základní funkcí mitochondrií jako hlavních energetických organel je oxidativní fosforylace spojená s produkcí ATP (adenosintrifosfátu). Mitochondrie mají ale také klíčový význam v indukci buněčné smrti. Mitochondriální dráha apoptózy (neboli vnitřní apoptotická dráha) je aktivována hlavně nerekceptorovými stimuly, zahrnujícími cytotoxický stres, endoplazmatickoretikulární (ER) stres, poškození DNA, cytokinovou deprivaci, nedostatek růstových faktorů, ale mohou ji aktivovat také receptory smrti (death receptors) (obr. 1). K iniciaci mitochondriální apoptotické dráhy dochází nejméně třemi možnými mechanismy: 1. uvolněním proapoptotických proteinů iniciujících kaspázovou aktivitu; 2. poškozením elektronového transportu, oxidativní fosforylace a produkce ATP, která může vést k energetické katastrofě; 3. změnou redoxního potenciálu s následkem zvýšení buněčného oxidativního stresu [17]. Následkem iniciace vnitřní apoptotické dráhy dochází k in-

korporaci proteinů Bax a Bak z cytosolu do vnější mitochondriální membrány. Aktivovaný protein Bax je translokován do vnější mitochondriální membrány z cytosolu buňky, zatímco aktivovaný protein Bak je již začleněn do vnější mitochondriální membrány, kde se váže na proteiny Mcl1 a Bclxl [18–21]. Inkorporace proteinů Bax a Bak do mitochondriální membrány má směrodatný následek – permeabilizaci mitochondriální membrány. Mitochondrie jsou charakteristické membránovým potenciálem okolo 150 mV a mitochondriálním gradientem pH. Tyto biochemické parametry mitochondrií se účastní vzniku protonového elektrochemického gradientového potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně. Tento primární bioenergetický parametr přes redukci elektronů prostřednictvím respiračního elektronového transportního řetězce (electron transport chain – ETC) kontroluje produkci mitochondriálního ATP. Narušení membránového potenciálu vede k permeabilizaci mitochondriální membrány s následným uvolněním proapoptotických faktorů, jako jsou cytochrom c, SMAC, DIABLO, z intermembránového mitochondriálního prostoru do cytosolu. Tyto události vedou k sestavení apoptotického proteinového komplexu zvaného apoptozóm tvořeného prokaspázou 9, proteinem Apaf-1 a cytochromem c, s následnou aktivací kaspázy 3 a dalších exekčních kaspáz. Mimo to protein Bax může také indukovat apoptózu přes mitochondriální poškození i v případě neaktivních kaspáz [22]. Buněčná signalizace indukující apoptózu vede k dalším mitochondriálním změnám, jako otevření permeabilních tranzitních pórů (PT pórů), které je vysoce regulováno iontovými kanály lokalizovanými v kontaktním místě vnitřní a vnější mitochondriální membrány [23]. PT póry jsou velké proteinové komplexy, primárně určené k transportu adeninových nukleotidů, cyklofilinu D a k regulaci aniontových kanálů závislých na napětí (VDAC, poriny), které mohou interagovat s dalšími proteiny [23,24]. Otevření PT pórů umožňuje průchod látek o velikosti až 1 500 Da a vede k depolarizaci mitochondrií. Otevření PT pórů také zvyšuje propustnost molekul vody



Obr. 1. Mitochondriální regulace apoptózy.

Vnitřní apoptotická signální dráha je charakteristická změnou transmembránového potenciálu a permeabilizací mitochondriální membrány, následkem čehož dochází k uvolnění proapoptotických signálů z mitochondrií. Upraveno dle [65].

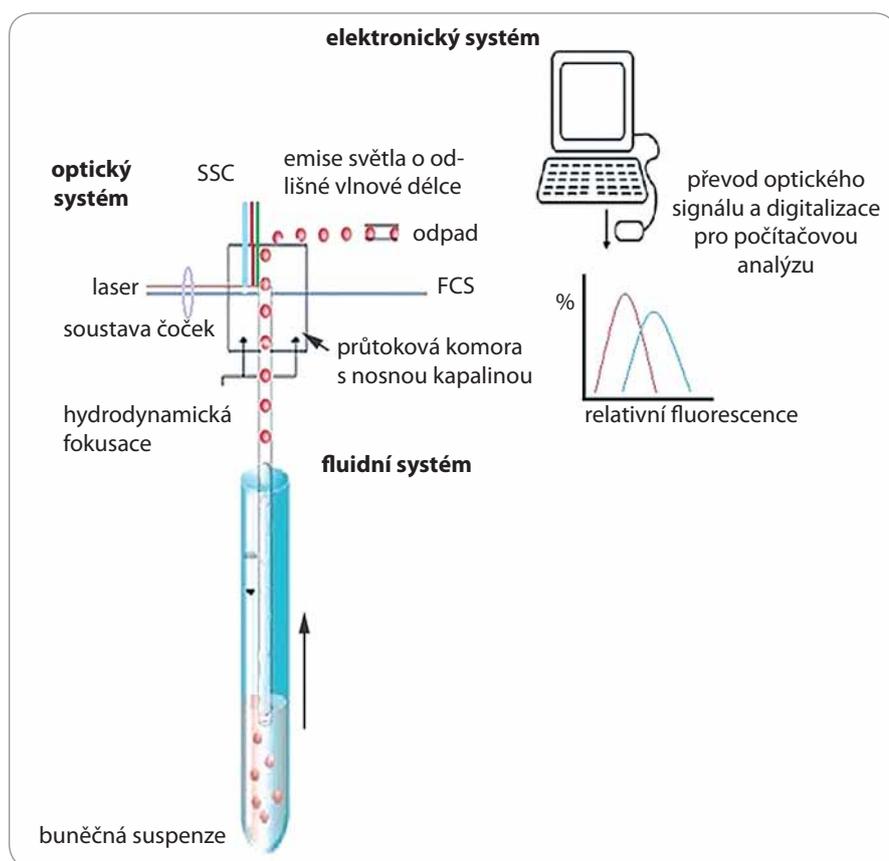
přes mitochondriální membránu s následným zvyšováním koncentrace vody v mitochondriální matrix a bobtnáním mitochondrií [25,26]. Depolarizace mitochondriální membrány vede k inhibici respirace, tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů a ztrátě produkce ATP [23,27].

Princip průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálních a chemických vlastností buněk nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Ve chvíli, kdy buňka prochází paprskem, dojde k rozptylu a lomu světla, jenž je podle směru a úhlu lomu označován jako přímý rozptyl (forward scat-

ter – FSC) a boční rozptyl (side scatter – SSC). FSC je charakterizován lomem světla o malém úhlu (2–13°) a je úměrný velikosti buňky, úhel SSC je 90° a charakterizuje vnitřní buněčné struktury, např. granularitu buňky. Dále je průtokovým cytometrem detekována fluorescence procházejících mikroskopických částic. Na analyzované buňky nebo jejich části se váží fluorescenční barviva (fluorochromy), která absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují (emitují) část takto absorbovaného světla o odlišné vlnové délce.

Průtokový cytometr se skládá z fluidního, optického a elektronického systému (obr. 2). Pomocí fluidního systému jsou buňky nasávány pod tlakem do průtokové komory s nosnou kapali-



Obr. 2. Schematické znázornění principu průtokové cytometrie.

Průtokový cytometr (fluidní systém) umožňuje nasávání buněčné suspenze vzorku a její rozdělení do jednotlivých buněk. V optické části jsou buňky ozářeny laserovými paprsky a změny světelných kvant o specifické vlnové délce jsou detekovány příslušnými optickými detektory. Světelné signály jsou následně elektronickým systémem převedeny do elektrického signálu a digitalizovány pro počítačovou analýzu.

nou, kde dochází k jejich separaci a kde paprsek monochromatického laseru prochází buňkou. Optický systém sestává z excitační části, tvořené laserem a soustavou čoček a hranolů usměrňujících paprsek, a z části sběrné, která se skládá z optických zrcadel a filtrů umožňujících detekci světelných kvant specifické vlnové délky příslušnými optickými detektory. K převodu optického signálu na elektrický a k digitalizaci pro počítačovou analýzu slouží elektronický systém. Analyzovaná data mohou být zobrazena jako tzv. dot plot, dvourozměrný graf, kde každá tečka reprezentuje jednu buňku, nebo ve formě histogramu pro jednoparametrovou analýzu. Výhodná je multiparametrová analýza umožňující výběr různých buněčných populací s různými vlastnostmi a jejich vzájemnou kombinaci. Průtokové cytometry jsou běžně vybaveny 2–3 detek-

tory, které měří světlo specifické vlnové délky emitované buňkou. Nejčastějšími fluorochromy se společnou excitační vlnovou délkou 488 nm (dosaženou argonovým modrým laserem) jsou fluorescein izothiokyanát (FITC), phycoerytrin (PE), peridin-chlorofyl (PerCP), phycoerytrin-Cy5 (PE-Cy5), Texas red aj. Fluorochromy mohou být konjugovány s různými protilátkami, a být tak využity pro vícebarevné analýzy. Speciální aplikací průtokové cytometrie je buněčné třídění (cell sorting), kdy jsou buňky tříděny do sběrných zkumavek na základě předem známých parametrů.

Detekce permeabilizace mitochondriální membrány

Více než půl století je známo, že některá barviva v určitém prostředí agregují. Tvorba agregátů je doprovázena dramatickým posunem v absorpčních i fluo-

rescenčních maximech barviva. Unikátní znak těchto barviv je užitečný při biologických studiích vlastností buněk a charakteristik buněčných struktur. Značná velikost molekul fluorescenčního barviva umožňuje jejich pomalou absorpci do sledovaných struktur, a jsou proto užitečné jako reportérové molekuly pro lokalizaci biochemických událostí [28]. Tyto molekulární sondy jsou schopny detekovat změny mitochondriálního membránového potenciálu průtokovou cytometrií. Mnoho z těchto sond je klasifikováno do třídy lipofilních kationtů. Sondy se akumulují v mitochondriální matrix, což je dáno negativním nábojem mitochondrií. Safranin [29,30], tetrafenylfosfonium (TPP) [31] a rhodamin 123 [32] jsou členy této třídy. Nicméně jejich nevýhodou je absence možnosti kvantifikace. TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester) a TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester) jsou fluorescenční deriváty rhodaminu 123, které mohou být užity ke kvantifikaci pomocí fluorescence [33,34], tak jako DiOC₆ (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide). DiOC₆ je jednou z nejčastěji používaných sond pro měření membránového potenciálu průtokovou cytometrií. Nevýhodou DiOC₆ je ovšem její vysoká toxicita zasahující respirační řetězec a při použití ultra-nízkých koncentrací vyžaduje přesné měření, což omezuje její využitelnost v porovnání s ostatními sondami. Sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanin iodid) je považována za nejvýkonnější sondu pro detekci změn mitochondriálního membránového potenciálu. Molekuly sondy JC-1 existují v monomerní formě a emitují fluorescence o vlnové délce 527 nm po excitaci světlem o vlnové délce 488 nm. V závislosti na membránovém potenciálu je sonda schopna vytvářet J-agregáty (čím větší polarizace membrány, tím větší akumulace sondy) spojené s emisí světla o vlnové délce 590 nm [35]. Při depolarizaci mitochondriální membrány dochází k následnému uvolňování sondy do cytosolu, které se projeví poklesem intenzity fluorescence.

Volné radikály

Současné výzkumy se ve zvýšené míře zaměřují na volné radikály a jejich roli

v nádorovém mikroprostředí. Volné radikály jsou molekuly s vysokou mírou nestability, která je vyvolána přítomností jednoho či více elektronů ve vnějším orbitu jejich atomů. Jejich vysoká reaktivita způsobuje vytrhávání elektronů ze sousedních atomů a následkem toho dochází k poškození funkce dané molekuly. Různé vnitřní a vnější okolnosti a/nebo biochemická aktivita mohou narušit kontrolu nad udržením rovnováhy mezi vznikem volných radikálů a jejich degradací. Antioxidanty jsou hlavním zdrojem ochrany těla proti volným radikálům. Antioxidanty transformují volné radikály do méně reaktivních a pro organismus méně škodlivých forem. Příkladem těchto antioxidantů jsou CAT (kataláza), SOD (superoxid dismutáza), GPx (glutathion peroxidáza) [36,37]. Nerovnováha mezi hladinou volných radikálů a jejich degradací antioxidanty se nazývá oxidativní stres a může zapříčinit poškození vedoucí k různým onemocněním [38]. Mezi volné radikály se řadí radikály kyslíku a dusíku, které jsou klíčovými regulátory v iniciaci a progresi nádorů. Radikály způsobují poškození genomu, zvyšují genetickou nestabilitu a zprostředkovávají modulaci různých procesů spojených s patogenezi nádorů, jako jsou apoptóza, angiogeneze, buněčný cyklus, invazivita, metastazování, metabolismus [39]. Různé reaktivní formy kyslíku jsou označovány jako ROS (reactive oxygen species) [40,41] a zahrnují superoxidové anionty ($O_2^{\cdot-}$), které jsou formovány NADPH oxidázami a jsou produkovány především v mitochondriích. Účinkem SOD (superoxid dismutázy) následně dochází k formování molekul peroxidu vodíku [41]. Další redukční procesy transformující peroxid vodíku cestou Fentonovy reakce do hydroxylových radikálů ($\cdot OH$) a poté do konečného produktu, kterým je voda, je zprostředkován účinkem katalázy (CAT) a glutathion peroxidázy [41]. Když molekuly kyslíku vážou protony jiných volných radikálů, vznikají hydroperoxidové radikály ($HO_2^{\cdot-}$) [42]. Mezi reaktivní formy dusíku označované RNS (reactive nitrogen species) patří volné radikály oxidu dusnatého ($NO\cdot$), peroxydusitany ($ONOO^-$), radikály oxidu dusného ($NO_2\cdot$) a dusitany (NO_2^-) [43]. $NO\cdot$ vzniká pro-

střednictvím proteinové rodiny NOS (nitric oxide synthetase). $ONOO^-$ vzniká reakcí $NO\cdot$ s molekulou O_2 , s $NO_2\cdot$ jako meziproductem. Tento meziproduct reaguje s $NO\cdot$ a tím vytváří N_2O_3 (dinitrogen-trioxid) [42]. NOS zahrnují různé izoformy: neurální (nNOS nebo NOSI), inducibilní (iNOS nebo NOSII), endoteliální (eNOS nebo NOSIII) a mitochondriální (mtNOS), všechny závislé na aktivitě NADPH a kalmodulinu [44]. Buněčné metabolické systémy neustále produkují volné radikály z kyslíku. Kolem 80 % molekul kyslíku je spotřebováno v mitochondriích a asi 5 % z nich je transformováno do superoxidových aniontů a hydroxylových radikálů. Endogenní (prostaglandiny, mastné kyseliny) a exogenní látky (léčiva, barviva, antioxidanty) jsou metabolizovány v hladkém endoplazmatickém retikulu, spotřebovávají 15 % molekul kyslíku, z nichž kolem 2–30 % je určeno k transformaci do volných radikálů, hlavně do hydroxylových radikálů. Makrofágy a leukocyty tvoří radikály jako obranný mechanismus proti bakteriím a virům. Volné radikály jsou užity v syntéze prostaglandinů, cholesterolu a steroidních hormonů. Hydroxylace lysinu a prolinu do hydroxylysínu a hydroxyprolinu je nutná pro biosyntézu kolagenu, což vyžaduje účast hydroxylových volných radikálů [45]. Volné radikály mají význam během metabolických a obranných dějů zdravých buněk. Jejich přítomnost v buňce je ovšem spojena s rizikem hlavně pro přítomné velké molekuly, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny, polysacharidy, lipidy, které mohou být poškozeny oxidací volnými radikály [45].

mtROS

Tvorba mitochondriálních ROS (mtROS) se odehrává v místě transportního elektronového řetězce (electron transport chain – ETC) v místě vnitřní mitochondriální membrány během procesu oxidativní fosforylace. Oxidativní fosforylace je důležitý buněčný proces, který využívá kyslíku a jednoduchých cukrů k vytvoření ATP, hlavního zdroje energie pro buňky. Součástí tohoto procesu je pět velkých proteinových komplexů, zvaných komplex I–V. Jednotlivé fáze ETC neprobíhají dokonale. Uvol-

nění elektronů z komplexu I a III vede k částečné redukci kyslíku na superoxidovou formu. Superoxidový aniont je rychle dismutován na peroxid vodíku dvěma dismutázami – superoxid dismutáza 2 v mitochondriální matrix a superoxid dismutáza 1 v mitochondriálním intermembránovém prostoru. Superoxidové anionty a peroxidy vodíku tvořené v tomto procesu jsou považovány za mitochondriální ROS. Superoxidové anionty mají elektrofilní vlastnosti a krátký poločas rozpadu. Mohou prostupovat přes vnější mitochondriální membránu a ovlivňovat signální cesty v cytosolu buňky [46]. Superoxidové anionty mohou navíc podléhat reakci s jinými radikály, jakými jsou oxidy dusíku (NO), a vytvářet peroxydusitany ($ONOO_2^{\cdot-}$) uvnitř mitochondrií a indukovat poškození DNA, narušení mitochondriální integrity a nevratné modifikace proteinů. Na rozdíl od superoxidových aniontů je peroxid vodíku nukleofilní a více stabilní. Navíc jeho koncentrace je stonásobně vyšší než u superoxidových aniontů [47]. Teoreticky by produkce mtROS měla být přímo úměrná s množstvím mitochondrií v buňce. Bylo dokázáno, že faktor mitochondriální biogeneze PGC1 α (factor peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α) zvyšuje nejen mitochondriální hmotnost, ale také expresi mnoha antioxidantů zahrnujících SOD2 GPx [48]. Mitochondriální hmotnost tedy není důležitý faktor, který reguluje tvorbu mtROS. Mitochondrie jsou dynamické orgány, jež často mění svůj počet, velikost, tvar a distribuci v odpovědi na intra- a extracelulární stimuly. Mitochondrie mohou podléhat selektivní autofagické degradaci zvané mitofagie [49]. Narušení těchto procesů je spojováno s neurodegenerativními onemocněními [50]. Procesy mitochondriálního dělení a fúze jsou důležité pro redistribuci jejich proteinů a ochraně proti škodlivým účinkům mutací mtDNA. Tyto procesy jsou regulovány proteiny N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)-like, které zahrnují mitofusin-1 a -2. Přesná regulace těchto procesů není popsána, ačkoli je doloženo, že mtROS zvyšují mitochondriální fragmentaci [51]. Zdravé, diferencované buňky spoléhají

v produkci ATP na mitochondriální respiraci (aerobní fosforylaci) v přítomnosti kyslíku (tvorba 36 mol. ATP/mol. glukózy). Za podmínek limitního množství kyslíku spoléhají buňky na anaerobní glykolýzu jako zdroj energie (tvorba 2 mol. ATP/mol. glukózy). Většina nádorových buněk se adaptuje na aerobní glykolýzu jako způsob produkce energie [52]. Tento fenomén je známý jako Warburgův efekt [53]. Ukázalo se, že nádorové buňky mají další energetické požadavky přesahující možnosti aerobní fosforylace, což zvyšuje oxidativní stres [54]. V rychle proliferujících nádorových buňkách podporuje přítomnost onkogenních mutací aberantní metabolismus a proteosyntézu s následkem zvýšené produkce ROS. Bylo zjištěno, že Warburgův efekt poskytuje výhodu transformovaným buňkám posílením antioxidantního systému k neutralizaci akumulace ROS. Jeden z klíčových glykolytických enzymů – pyruvát-kináza – hraje důležitou roli v tomto procesu, nádorové buňky exprimují přednostně M2 izoformu tohoto enzymu (PKM2) [55] a akutní zvýšení intracelulární hladiny ROS může inhibovat PKM2 oxidací cysteinových zbytků tohoto enzymu [56]. Inhibice PKM2 pak vede k produkci dostatečného redukčního potenciálu, který způsobuje detoxifikaci ROS odklonem glukózového metabolismu do pentózafosfátového cyklu. Tím, že nádorová buňka reguluje vlastnosti PKM2, poskytuje ochranu proti nadměrné produkci ROS běžně pozorované v nádorech [57].

Detekce mtROS

Přítomnost intracelulárních mtROS může být detegována fluorescenčními barvivy. Mezi nejčastěji používaná patří dichlorodihydrofluorescein (DCF) a dihydroethidium (DHE). Nevýhodou běžně užívaného fluorescenčního indikátoru ROS dichlorodihydrofluoresceinu je jeho nespecifičnost (je senzitivní k více typům ROS), nemůže být cílený do specifických intracelulárních kompartmentů a může při expozici světlem produkovat ROS, které mají za následek tvorbu artefaktů amplifikací signálu. DHE je fluorescenční indikátor superoxidových aniontů. Ve spojení s markery specifickými pro mitochondrie, jako je MitoTracker užívaný

pro konfokální mikroskopii, můžeme určovat, zdali jsou ROS generovány z mitochondrií [58,59]. HyPer plazmidy jsou první geneticky kódované fluorescenční senzory schopné detegovat intracelulární peroxidy vodíku. Plazmid je vytvořen vložením cDNA kódující žlutý fluorescenční protein do regulační domény proteinu OxyR *E. coli* [60]. HyPer plazmid vykazuje submikromolární afinitu k molekulám peroxidu vodíku a současně je necitlivý k ostatním druhům ROS. Plazmidy HyPer nezpůsobují artefakty ROS a mohou být užity pro detekci rychlých změn v koncentracích peroxidu vodíku v různých buněčných kompartmentech. Pro minimalizaci signálů přicházejících z ostatních nemitochondriálních organel se k detekci mtROS využívají fluorescenční indikátory modifikované k zacílení přímo na mitochondrie. Jsou založeny na bázi lipofilních kationtů, které jsou přitahovány elektronegativním prostředím mitochondrií způsobeným protonovým gradientem na vnitřní mitochondriální membráně. MitoSOX je DHE spojený s trifenyfosfoniem (TPP+). Využívá prudkého elektrochemického gradientu na vnitřní mitochondriální membráně a hromadí se uvnitř mitochondrií (stonásobně více v porovnání s cytosolem). MitoSox je účinně užíván k přímé detekci mitochondriálních superoxidových aniontů v různých buněčných typech [61]. Přidání motivu TPP+ k fenyloboronát esteru tvoří MitoPY1 [62], biologicky kompatibilní sondu pro detekci mitochondriálního peroxidu vodíku. Při zvýšení hladiny H₂O₂ dochází k významnému nárůstu fluorescence MitoPY1, kterou je možné detegovat konfokální mikroskopii i průtokovou cytometrií. Další sondy používané pro detekci mtROS jsou MitoAR, jež reaguje na •OH a HOCl•, a MitoHR, která je více senzitivní k •OH. Tyto sondy vznikly přidáním fluoroforu podobného rhodaminu k 4-amino-fenyl aryl etheru, nebo resp. k 4-hydroxy aryl ether skupině [63]. pHyPer-dMito je savčí expresní vektor obsahující sekvenci MTS (mitochondrial targeting sequence) odvozenou z podjednotky VIII lidské cytochrom c oxidázy, fúzané s HyPer (fluorescenční senzor peroxidu vodíku), který umožňuje detekci molekul peroxidu vodíku tvořených přímo v mitochondriích.

Závěr

Rakovina je velmi heterogenní onemocnění a různorodost mezi buněčnými populacemi nádorů může ovlivňovat jak jejich schopnost expanze a progresu, tak citlivost k protinádorové terapii. Mitochondriální buněčná smrt je důležitá součást života buněk a za patologických podmínek může dojít k narušení průběhu tohoto procesu. V důsledku změn v mitochondriální struktuře a funkci může vznikat chemorezistence nádorových buněk. Rozdíly membránového potenciálu mezi jednotlivými buňkami nádoru odráží buněčnou heterogenitu a prostřednictvím jeho analýzy mohou být identifikovány buňky, které jsou důležité v nádorové progresi. Membránový potenciál tak může být potenciální prediktor odpovědi na protinádorovou léčbu a/nebo přímý cíl chemoterapie [63]. Studium mitochondriálního potenciálu a detekce ROS může přispět k lepšímu porozumění apoptotického mechanismu a sestavení efektivnější léčby pro pacienty s nádorovým onemocněním.

Literatura

1. Svod.cz [internetová stránka]. Český národní webový portál epidemiologie nádorů. Masarykova univerzita, Česká republika; [citováno leden 2014]. Dostupný z: <http://www.svod.cz>.
2. Linkos.cz [internetová stránka]. Česká onkologická společnost ČLS JEP, Česká republika; [aktualizováno 11. srpna 2011; citováno leden 2014]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz>.
3. Hammoudi N, Ahmed KB, Garcia-Prieto C et al. Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications. *Chin J Cancer* 2011; 30(8): 508–525. doi: 10.5732/cjc.011.10267.
4. Alvero AB, Montagna MK, Holmberg JC et al. Targeting the mitochondria activates two independent cell death pathways in ovarian cancer stem cells. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(8): 1385–1393. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0023.
5. Dong LF, Jameson VJ, Tilly D et al. Mitochondrial targeting of α -tocopheryl succinate enhances its pro-apoptotic efficacy. A new paradigm for effective cancer therapy. *Free Radical Biol Med* 2011; 50(11): 1546–1555. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.032.
6. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 1999; 59 (7 Suppl): 1701S–1706S.
7. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96(2): 245–254.
8. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239–257.
9. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383–424.
10. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281(5381): 1312–1316.

11. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013–2026.
12. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182(5): 1545–1556.
13. Cuende E, Alés-Martínez JE, Ding L et al. Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *The EMBO Journal* 1993; 12(4): 1555–1560.
14. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281(5381): 1322–1326.
15. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(17): 7834–7838.
16. Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 2004; 304(5668): 253–257.
17. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381): 1309–1312.
18. Willis SN, Chen L, Dewson G et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 2005; 19(11): 1294–1305.
19. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139(5): 1281–1292.
20. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(8): 3668–3672.
21. Lindsten T, Ross AJ, King A et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 2000; 6(6): 1389–1399.
22. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(25): 14559–14563.
23. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341(Pt 2): 233–249.
24. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619–642.
25. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13(15): 1899–1911.
26. Lemasters JJ, Nieminen A, Qian T et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1366(1–2): 177–196.
27. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R et al. Mitochondria and cell death: mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999; 264(3): 687–701.
28. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hrtshorn C et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(9): 3671–3675.
29. Akerman KE, Wikstrom MK. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 1976; 68(2): 191–197.
30. Nicholls DG. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. *Biochem J* 1978; 176(2): 463–474.
31. LaNoue KF, Strzelecki T, Strzelecka D et al. Regulation of the uncoupling protein in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 1986; 261(1): 298–305.
32. Emanus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochem Biophys Acta* 1986; 850(3): 436–448.
33. Loew LM, Tuft RA, Carrington W et al. Imaging in five dimensions: time-dependent membrane potentials in individual mitochondria. *Biophys J* 1993; 65(6): 2396–2407.
34. Ehrenberg B, Montana V, Wei MD et al. Membrane potential can be determined in individual cells from the Nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J* 1988; 53(5): 785–794.
35. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197(1): 40–45.
36. Shen K, Ji L, Chen Y et al. Influence of glutathione levels and activity of glutathione-related enzymes in the brains of tumor-bearing mice. *Bioscience trends* 2011; 5(1): 30–37.
37. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol Med* 2001; 30(11): 1191–1212.
38. Polidori MC, Stahl W, Eichler O et al. Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radical Biol Med* 2001; 30(5): 456–462.
39. Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 2007; 75(2): 247–260.
40. Jian Liu K, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biol Med* 2005; 39(1): 71–80.
41. Griending KK, Sorescu D, Lasseue B et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(10): 2175–2183.
42. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001; 53(1): 135–159.
43. Mahelkova G, Korynta J, Moravova A et al. Changes of extracellular matrix of rat cornea after exposure to hypoxia. *Physiol Res* 2008; 57(1): 73–80.
44. Singh S, Gupta AK. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO based anticancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67(6): 1211–1224. doi: 10.1007/s00280-011-1654-4.
45. Wright DT, Cohn LA, Li H et al. Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. *Environ Health Perspects* 1994; 102 (Suppl 10): 85–90.
46. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 2007; 100(4): 460–473.
47. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3–4): 222–230.
48. St-Pierre J, Drori S, Uldry M et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006; 127(2): 397–408.
49. Barbour JA, Turner N. Mitochondrial stress signaling promotes cellular adaptations. *Int J Cell Biol* 2014; 2014: 156020.
50. Okamoto K, Kondo-Okamoto N. Mitochondria and autophagy: critical interplay between the two homeostats. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(5): 595–600. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.08.001.
51. Pangare M, Makino A. Mitochondrial function in vascular endothelial cell in diabetes. *J Smooth Muscle Res* 2012; 48(1): 1–26.
52. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930): 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.
53. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(5): 325–337. doi: 10.1038/nrc3038.
54. Wellen KE, Thompson CB. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Mol Cell* 2010; 40(2): 323–332. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.004.
55. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008; 452(7184): 230–233. doi: 10.1038/nature06734.
56. Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 2011; 334(6060): 1278–1283. doi: 10.1126/science.1211485.
57. Hamanaka RB, Chandel NS. Cell biology. Warburg effect and redox balance. *Science* 2011; 334(6060): 1219–1220. doi: 10.1126/science.1215637.
58. Zmijewski JW, Moellering DR, Le Goffe C et al. Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(2): H852–H861.
59. Landar A, Zmijewski JW, Dickinson DA et al. Interaction of electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and formation of reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(5): H1777–H1787.
60. Choi H, Kim S, Mukhopadhyay P et al. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 2001; 105(1): 103–113.
61. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Hasko G et al. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat Protoc* 2007; 2(9): 2295–2301.
62. Dickinson BC, Chang CJ. A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living cells. *J Am Chem Soc* 2008; 130(30): 9638–9639. doi: 10.1021/ja802355u.
63. Koide Y, Urano Y, Kenmoku S et al. Design and synthesis of fluorescent probes for selective detection of highly reactive oxygen species in mitochondria of living cells. *J Am Chem Soc* 2007; 129(34): 10324–10325.
64. Houston MA, Augenlicht LH, Heerdt BG. Intrinsic mitochondrial membrane potential and associated tumor phenotype are independent of MUC1 over-expression. *PLoS One* 2011; 6(9): e25207. doi: 10.1371/journal.pone.0025207.
65. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 4): 807–815. doi: 10.1242/jcs.099234.

Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk

Methods for Studying Tumor Cell Migration and Invasiveness

Kovaříková P.¹, Michalová E.², Knopfová L.³, Bouchal P.^{1,2}

¹ Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

² Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

³ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

Souhrn

Migrace a invazivita jsou fenotypovými vlastnostmi buněk, které významně přispívají k průběhu žádoucích fyziologických dějů, jako je hojení ran či embryogeneze, i k velmi závažným patologickým procesům, především pak k metastazování nádorů. Dostupnost vhodných metod studia migračních a invazivních vlastností buněk je tedy zásadní pro pochopení molekulární podstaty těchto dějů a v případě nádorových onemocnění je migrační, invazivní a metastatický potenciál nádorových buněk klíčovým faktorem určujícím klinickou prognózu pacienta. Tento článek podává přehled základních metod *in vitro* a *in vivo*, které se využívají při studiu buněčné migrace, invazivity a mechanismů metastazování nádorů. *In vitro* metody studia buněčné migrace zahrnují jednoduché dvourozměrné testy (scratch-wound assay a test založený na účinku hepatocytárního růstového faktoru) a dále metody využívající účinku chemotaxe (Dunnova komůrka, videomikroskopie buněk a použití nosičů s chemoatraktanty). Metody pro studium buněčné migrace a invazivity *in vitro* zahrnují složitější systémy založené na principu Boydenovy komůrky (Transwell migrační/invazivní test, analýza buněčné migrace a invazivity pomocí systému xCELLigence, a analýzy prováděné s využitím konfokální mikroskopie) a rovněž pak metodu studia buněčné migrace v mikrokanálcích. Přehled *in vivo* metod shrnuje základní organizmy a metody užívané ke studiu buněčné migrace a invazivity s hlavním důrazem na studium metastazování *in vivo* v myších modelech. Popsané metody se uplatňují především ve výzkumných projektech zaměřených na vývoj nových diagnostických a terapeutických přístupů v onkologii.

Klíčová slova

migrace – invazivita – *in vitro* assaye – *in vivo* modely – metastazování – nádorové buňky

Summary

Migration and invasiveness are phenotypic characteristics of cells that contribute to physiological processes, such as wound healing or embryogenesis and they are involved in serious pathological processes, namely in tumor cell metastasis. Availability of methods for studying migration and invasiveness of the cells is important for understanding molecular basis of these processes. In the case of cancer, migration, invasiveness and metastatic potential of tumor cells are key factors that determine clinical prognosis of the patients. This communication provides an overview of *in vitro* and *in vivo* methods which are used to study cell migration, invasion and metastasis. *In vitro* methods for studying cell migration include simple two-dimensional assays (scratch – wound assay and the assay based on the effect of hepatocyte growth factor) and methods based on chemotaxis (Dunn's chamber, videomicroscopy of cells, the use of carriers with chemoattractants). Methods for studying both cell migration and invasiveness *in vitro* include more complex systems based on the principle of the Boyden chamber (transwell migration/invasive test, analysis of cell migration and invasion in xCELLigence system, confocal microscopy based approaches) as well as analysis of cell migration in micro-channels. Our overview of *in vivo* methods provides an introduction into model organisms and methods used in this field, with an emphasis on the study of cancer metastasis in mouse models. The methods described in this review are mainly involved in larger research projects aiming at developing new diagnostic and therapeutic approaches in oncology.

Key words

migration – invasiveness – *in vitro* assays – *in vivo* models – metastasis – tumor cells

Práce byla podpořena projektem Grantové agentury České republiky č. 14-19250S, Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the project of Czech Science Foundation No. 14-19250S, by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: bouchal@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 27. 1. 2014

Přijato/Accepted: 31. 3. 2014

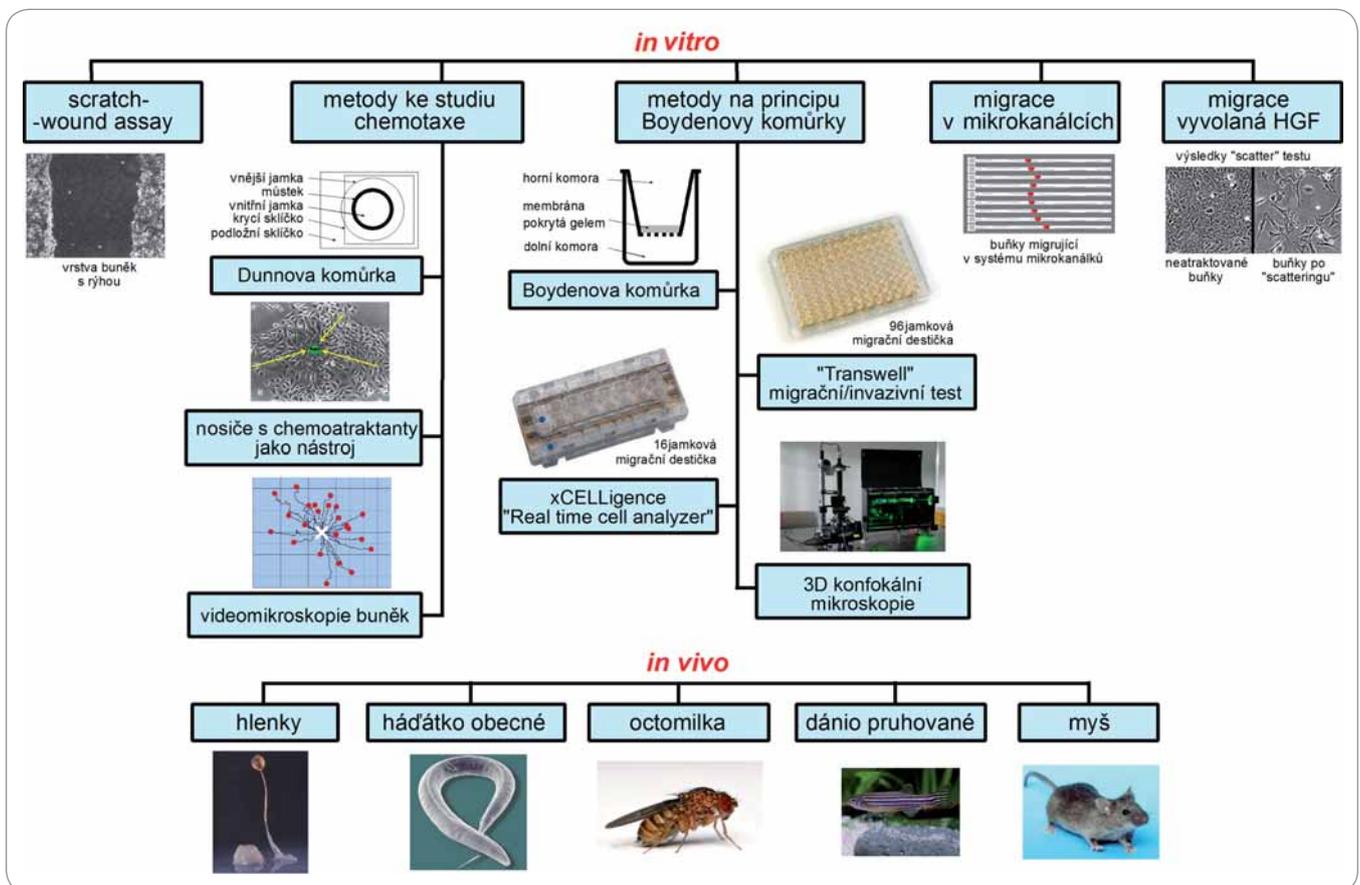
Úvod

Buněčná migrace a invazivita hrají podstatnou úlohu v řadě biologických procesů, jako je např. embryogeneze, imunitní odpověď, hojení ran, morfogeneze či zánět [1]. V onkologii mají zásadní význam v metastazování nádorových buněk, což je nejčastější příčina vedoucí k terminálnímu stadiu nádorového onemocnění. Tvorba metastáz probíhá během multifaktoriálního a víceúrovňového procesu zvaného metastatická kaskáda [2,3]. Jejím prvním krokem je oddělení nádorové buňky od primárního nádoru [3]. Díky zvýšené expresi proteáz, které zásadně přispívají k invazivní schopnosti buněk štěpením extracelulární matrici (ECM), tyto buňky následně pronikají bazální membránou a mohou postupovat do stromatu [2]. Stromální buňky přitom mohou zvyšovat jejich agresivní potenciál a podílet se na procesu epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) [4,5], vedoucím ke ztrátě buněčné adheze, epiteliální polaritě a zvýšené

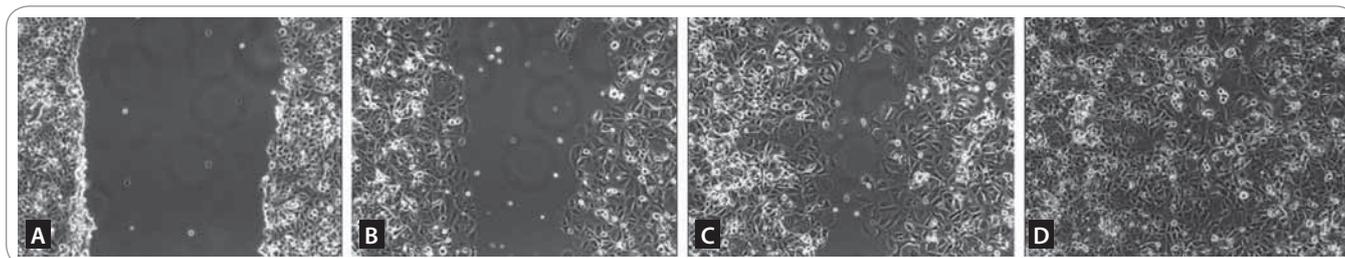
migrační a invazivní schopnosti nádorových buněk. Buňky s mezenchymálním fenotypem pak pronikají do cévního systému procesem označovaným jako intravazace, krevním řečištěm putují do oblasti vzdáleného orgánu, kde mohou po extravazaci vytvořit sekundární nádor neboli metastázu.

Buněčná migrace je proces velmi komplikovaný a při jejím studiu je třeba brát v úvahu řadu biologických aspektů [6]. Pro studium migrace jsou nejčastěji užívány *in vitro* modelové systémy na bázi buněčných linií, nicméně podmínky, ve kterých buňky migrují, jsou zde značně zjednodušeny, a výsledky proto nemusí plně reflektovat skutečné chování v organizmu. Studium buněčné invazivity se obvykle realizuje v prostředí substrátu, jenž se složením podobá přirozené ECM, jako je kolagen či Matrigel® (obchodní název pro želatinovou proteinovou směs, odvozenou z myších nádorových buněk [7]). Experimentálně podstatně náročnější, avšak reálným podmínkám

bližší jsou metody studia *in vivo* ve zvířecích modelech [6]. Za účelem porovnání procesů migrace, invazivity a s nimi spojené adheze jsou nadále vyvíjeny nové metody studia, díky nimž je možné studovat mechanismy migrace buněk a buněčných souborů ve vztahu k regulačním mechanismům. V kombinaci se studiem buněčné migrace a invazivity jsou pak využívány techniky molekulární biologie, biochemie (zejména genomiky a proteomiky) i pokročilé zobrazovací techniky. Kombinace uvedených přístupů je vhodný nástroj při studiu komplexních patologických procesů, jako je právě tvorba metastáz. Tyto metody (obr. 1) umožňují nejen studovat migraci různých typů buněk, ale také analyzovat úlohu jednotlivých prometastatických genů a proteinů i jejich funkčních partnerů, uplatňují se při jejich funkční charakterizaci a validaci směrem k vývoji nových diagnostických a terapeutických přístupů. Cílem výzkumu je využít získané poznatky ke zvyšování



Obr. 1. Schéma metod studia buněčné migrace a invazivity.
Celkové schéma všech metod popisovaných v článku, doplněné o vystihující obrázky.



Obr. 2. Scratch-wound assay – zacelování rýhy.

Čtyři stadia průběhu experimentu prováděného na buňkách linie MCF-7. A. Do monovrstvy buněk je špičkou pipety vytvořena rýha o předem definované velikosti. B. Stejně místo na misce foceně po 24 hod. Buňky na okraji rýhy polarizují a migrují směrem k jejímu středu ve snaze ji zacelit. C. Stav po 72 hod. D. Stav po 120 hod. Rýha je zcela zacelena migrujícími buňkami.

efektivity diagnostiky, léčby a prevence nádorových onemocnění.

Jednoduché metody ke studiu buněčné migrace *in vitro*

Scratch-wound assay

Scratch-wound assay (zacelování rýhy) je běžně užívaná jednoduchá metoda pro měření základních parametrů buněčné migrace, jako jsou především rychlost migrace a polarita buněk [8]. Buňky jsou kultivovány v běžném kulti-vačním médiu, dokud nevytvorí souvislou vrstvu. Následně je do této vrstvy špičkou pipety o definované velikosti vytvořena rýha [9,10]. Buňky na okraji rýhy polarizují a začínají samovolně migrovat směrem ke středu rýhy ve snaze ji zacelit (obr. 2) [11]. Obvyklým způsobem monitorování pohybu buněk je intervalové snímání mikroskopem [8]. Motilitu je možno kvantifikovat pomocí času nezbytného pro kompletní zacelování rýhy, k čemuž lze využít softwarové hodnocení pokrytí snímané oblasti buňkami. Důležité je však vzít v úvahu příspěvek proliferace buněk na samotné zacelování během experimentu. K její inhibici je nezbytné přidání inhibitorů proliferace do média (běžně je používán např. mitomycin C). Metoda je vhodná ke studiu procesu hojení mechanických poranění. Ve vztahu k metastazování nádorových buněk lze tuto metodu např. využít k základnímu studiu prometastatických genů a proteinů i jejich vlivu na migrační schopnost buněk.

Scatter test

Metoda je založena na monitorování odpovědi určitých buněčných linií na stimulaci prostřednictvím hepatocytár-

ního růstového faktoru (hepatocyte growth factor – HGF) [12,13]. Po ní dochází u těchto buněk k tzv. buněčnému scatteringu, tedy rozptýlení z buněčné kolonie, který je důsledkem reorganizace aktinového cytoskeletu, narušení mezibuněčných spojů a následné zvýšené schopnosti migrace. Jde o morfologickou změnu obdobnou procesu EMT. Průběh scatter testu je monitorován mikroskopem s intervalovým snímáním. Je hodnoceno procentuální zastoupení nesoudržných/uvolněných buněk, u kterých došlo k buněčnému scatteringu, k celkovému počtu buněk. Tak lze testovat vliv exprese jednotlivých genů na změny migrace. Původně byla tato metoda vyvinuta pro buněčnou linii MDCK (buňky odvozené z normálních psích ledvin), později byla použita i pro linii lidských prostatických nádorových buněk DU145 ke studiu úlohy vybraných proteinů (Cdc42, p21 aktivovaných kináz, p210ctn) v procesu EMT [12].

In vitro metody ke studiu buněčné migrace na principu chemotaxe

Chemotaxe migrujících buněk má obrovský význam v mnoha biologických procesech včetně tvorby metastáz [14].

Dunnova komůrka

Jedná se o metodu, která umožňuje mikroskopické pozorování migrace buněk v reálném čase v odpovědi na přítomnost chemoatraktantu [15]. Využívá usměrněného pohybu buněk z vnější jamky Dunnovy komůrky po můstku vedoucím do vnitřní jamky s chemoatraktantem (obr. 1), přičemž tento pohyb po můstku je snímán mikroskopem a zaznamenáván v pravidelných intervalech.

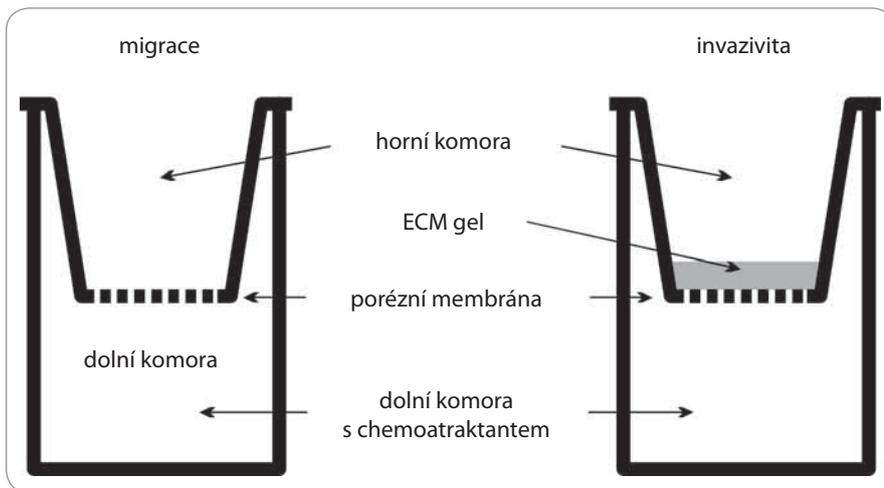
Metodika je užitečný nástroj ke studiu chemotaxe [16], jako jednoho z migračních mechanismů buněk, způsobených gradientem difúzních signálních faktorů, které přispívají rovněž k metastatickým procesům.

Videomikroskopie buněk

Videomikroskopie umožňuje vizualizaci a kvantifikaci chemotaxe, a to zejména u adherentních savčích buněk, jako jsou buňky nádorové či endoteliální [17]. Tato metoda využívá videomikroskopický záznam pohybu buněk, na jehož základě se odvozuje trajektorie (obr. 1) každé jednotlivé buňky, která migruje v chemotaktickém gradientu obvykle po dobu 12–24 hod. Ten se vytváří díky soustavě kanálků a komůrek pod speciálním mikrosklíčkem (μ -Slide Chemotaxis), pod nímž se pohybují buňky. Touto metodou lze vyhodnocovat např. vliv inhibitorů na chemotaxi. Inhibitory chemotaxe jsou přitom zvažovány jako terapeutika zamezující metastazování [17].

Nosiče s chemoatraktanty jako nástroj pro studium chemotaxe

Schopnost buněk reagovat na vnější podněty hraje významnou roli v řízení usměrněné migrace buněk, tedy při cílení buněčného pohybu vedoucímu k zakládání metastáz [18,19]. Pro studium migrace buněčných souborů i pro buněčné explantáty (živá tkáň pro tkáňovou kulturu) byla vytvořena metoda využívající nosičů s chemoatraktanty. Na malé misce pokryté proteiny reprezentující ECM (např. fibronectin) a zalité živným médiem jsou umístěny kulaté nosiče s chemoatraktivními molekulami, do jejichž blízkosti jsou následně vloženy



Obr. 3. Boydenova komůrka.

Schéma základní Boydenovy komůrky (vlevo) a komůrky s membránou pokrytou gelem z ECM (extracelulární matrix) pro studium invazivity buněk (vpravo). Buňky jsou nanášeny do horní komory a migrují skrz porézní membránu do dolní komory s chemoatraktantem. Je-li membrána pokryta vrstvou gelu, buňky mají ztížené podmínky a musí invadovat skrze něj.

buňky nebo buněčné explantáty. V okolí chemoatraktantu se ihned tvoří chemo-taktický gradient, který může vyvolat migraci buněk (obr. 1). Ta je snímána mikroskopem v pravidelných intervalech. Metoda umožňuje nejen pozorovat populace stejných typů buněk, ale i srovnávat odlišné chemotaktické chování dvou nebo více buněčných typů zároveň.

In vitro metody ke studiu buněčné migrace a invazivity založené na principu Boydenovy komůrky **Boydenova komůrka**

Metoda původně vyvinutá pro studium chemotaxe leukocytů se stala vhodným nástrojem pro pozorování motility a invazivity nádorových buněk [16]. Klasická Boydenova komůrka (obr. 3) sestává ze dvou prostorů oddělených membránou [20]. V horní části jsou buňky v živném médiu a v části spodní v médiu s obsahem chemoatraktantu. Membrána mezi nimi představuje fyzikální bariéru, kterou mohou buňky překonat pouze aktivním pohybem. Toto uspořádání se využívá ke studiu migračních vlastností buněk. Komora může být však modifikována pro studium invazivních vlastností nádorových buněk pokrytím mikroporézní membrány vrstvou, jejíž složení je blízké ECM. V tom případě hovoříme o trojrozměrném (3D) prostředí.

Pro pokrytí membrány se využívají matrice jako kolagen nebo Matrigel®, kdy během procesu simulujícího buněčnou invazi dochází k interakci nádorových buněk s komponentami ECM a buněčné adhezi a proteolytické degradaci ECM substrátu. Další výhodou je, že v tomto 3D prostředí jsou buňky přirozeněji polární, a jejich chování je proto bližší podmínkám *in vivo*.

Transwell migrační/invazivní test

Běžně užívané komerční kvantitativní *in vitro* testy migrace a invazivity jsou převážně založeny na originálním systému Boydenovy komůrky [21]. Transwell® Invasion Assay představuje komerční variantu založenou na jednorázových plastových vícejamkových destičkách s mikroporézní membránou (obr. 1) [22], do níž jsou buňky umístěny na jednu stranu membrány a chemoatraktanty na druhou. Po určitém čase průběhu experimentu jsou buňky vizualizovány fluorescenčním (nebo jiným) barvením a buněčná migrace hodnocena na základě podílu buněk, které prošly skrze membránu směrem k oblasti vyšší koncentrace chemoatraktantu. Experimentální sestava ke studiu buněčné invazivity může být vytvořena zablokováním porů v membráně gelem o složení blízkém ECM (kolagen, Matrigel®), invazivita

je tak podmíněna proteolytickou degradací ECM složek.

xCELLigence systém – analýza migrace a invazivity v reálném čase

xCELLigence systém (RTCA DP – Real-time cell analyzer double plate, Roche/Acea Biosciences) je nová technologie rovněž založená na principu Boydenovy komůrky, umožňující sledování buněčné migrace, invazivity, ale i proliferace, adheze buněk a vlivu chemotaxe a cytotoxicity na ně v reálném čase [23,24]. Na rozdíl od Transwell migračního testu jsou tedy buňky sledovány nepřetržitě (nikoliv pouze v jednom zvoleném časovém okamžiku) bez nutnosti fluorescenčního barvení při ukončení experimentu. Přístroj se skládá ze dvou základních částí: 1. RTCA DP analytické a 2. kontrolní jednotky. Do analytické jednotky se vkládají destičky s různým počtem jamek, v nichž probíhají jednotlivé experimenty.

K měření migrace a invazivity je využíváno destiček CIM-plate 16 (cell invasion and migration, obr. 1). Každá jamka v destičce představuje migrační komůrku, která se skládá ze dvou částí oddělených mikroporézní polyetylen-tereftalátovou (PET) membránou, do jejíž spodní části jsou integrovány mikroelektronické senzory [25]. Horní komora obsahuje médium se sledovanými buňkami. K měření invazivity se podobně jako u Transwell assay přidává vrstva gelu o složení blízkém složení ECM (např. Matrigel®). Spodní komora obsahuje médium s chemoatraktantem [11,25]. Jak buňky během experimentu migrují z horní komory přes membránu směrem k chemoatraktantu, přicházejí do kontaktu s elektrickými senzory a jejich počet je přímo úměrný měřené impedanci (komplexní veličina popisující zdánlivý odpor součástky při průchodu střídavého elektrického proudu).

Ke zjišťování míry buněčné adheze a proliferace se využívá destiček E-plate 16. Jamky v nich jsou jednoduché, bez rozdělení membránou na dvě komory. Dno jamky je pokryto elektrodami, které umožňují měření změny impedance v odpovědi na přisednutí buněk na dno jamky [11]. Nejdříve se změří signál kultivačního média bez přidavku buněk a následně jsou zazname-

návány změny impedance v důsledku zvýšené adheze či proliferace přidávaných buněk [11,23,24].

Výstupem experimentu prováděného v systému xCELLigence je tzv. buněčný index (cell index – CI). Jde o bezrozměrnou veličinu, k jejímuž výpočtu se využívá vztahu: $CI = (Z_i - Z_0)/15 W$, kde Z_i je impedance v daném okamžiku experimentu a Z_0 pak impedance pozadí (média před přidáním buněk) [26]. Hodnoty CI pro různé paralelní experimenty jsou poté dávány do vztahu s konkrétní studovanou vlastností buněk.

In vitro studium migrace a invazivity pomocí trojrozměrné konfokální mikroskopie

Využití konfokálního mikroskopu umožňuje zaznamenávat pohyb buněk v prostoru a čase [27]. Pro studium buněčné migrace a invazivity se v tomto případě kombinuje Boydenova komůrka ve výše popsaném uspořádání se záznamem obrazu získaného konfokálním mikroskopem. Test je pak prováděn tak, že nejdříve sestavíme migrační experiment v Boydenově komůrce s membránou pokrytou 3D ECM gelem. Po nanesení studovaných nádorových buněk je gel vyříznut. Míra migrace, resp. invazivity je poté monitorována ve 3D projekci konfokálním mikroskopem a zaznamenávána v reálném čase. Lze přitom využít jak mikroskopie v procházejícím světle, tak fluorescenčního značení buněk, buněčných struktur a molekul.

Studium buněčné migrace v mikrokanálcích

Jedná se o univerzální, jednoduchou metodu studia buněčné migrace v mikrokanálcích o přesně definovaném tvaru [28,29]. Tento test je považován za 3D metodu studia buněčné migrace. Sestavy paralelních kanálků (obr. 1) se vyrábějí na míru pro konkrétní experimenty, materiálem jsou většinou transparentní silikonové pryže. Konstrukce kanálku určuje míru omezení pohybu buněk, což je dáno adhezivitou materiálu, lokálními zúženími a ohyby mikrokanálků. Buňky procházejí paralelními mikrokanálky, přičemž pomocí světelného mikroskopu jsou sledovány vzdálenosti, které buňky v paralelních experimentech urazí za daný čas. Tímto způsobem je možné

srovnávat migraci různých buněčných linií, anebo izogenních buněčných linií exprimujících studované proteiny s potenciálními migračními úlohami. Obecně je tedy možno porovnávat a hodnotit různé parametry ovlivňující migraci v paralelních mikrokanálcích v závislosti na designu experimentu.

Metody studia metastazování in vivo

In vivo testování je nezbytnou součástí výzkumu v oblasti nádorové biologie, tj. zkoumání molekulární podstaty onemocnění, rozvoje diagnostických přístupů a vývoje efektivnější léčby včetně nových terapeutik. Savčí *in vivo* modely umožňují oproti výše popsaným *in vitro* experimentům lépe přiblížit experimentální podmínky komplexnímu stavu organismu, tedy podmínkám, v nichž dochází k patologickým procesům, které není možno dostatečně v podmínkách *in vitro* simulovat. *In vivo* experimenty tudíž poskytují relativně věrohodnější výsledky, jsou však experimentálně a ekonomicky značně náročné. Vlastní vývoj geneticky modifikovaných modelových organismů se tak sám o sobě stal nepostradatelným podpůrným odvětvím výzkumu, bez něhož by nebylo možno studovat fyziologické a patologické děje v tak komplexním systému, jako je živý organismus. Ke studiu buněčné migrace a invazivity *in vivo* se využívá celá řada organismů (obr. 1). Hlenky *Dictyostelium discoideum* zásadně přispěly porozumění chemotaxe a identifikaci jejich potenciálních regulátorů [30]. Hádátka obecné (*Caenorhabditis elegans*) díky svému průhlednému tělu a možnosti vizualizace buněk pomocí proteinu GFP (green fluorescence protein) umožňuje analýzu přirozených a patologických migratorních cest [31], stejně tak průsvitná embrya a kukly octomilky (*Drosophila*) dovolují pozorování migrace určitých typů buněk [32,33]. Fluorescenčně značené neutrofilní ryby dánie pruhovaného (*Danio rerio*) pak byly využity např. pro studium buněčných procesů během zánětu [34,35].

Myš – nejpoužívanější in vivo model v nádorové biologii

Nejpoužívanější organismus ke studiu mechanismů vzniku nádorů, nádoro-

vého růstu a procesů metastatické kaskády *in vivo* je však myš domácí (*Mus musculus*) [36–38]. V laboratorní praxi se nejčastěji používají dva jednoduché experimentální testy pro vznik plicních a jaterních metastáz a dva spontánní testy pro prsní a prostatické karcinomy. Využívá se myších nádorových buněčných linií v syngenních imunokompetentních (schopných imunologické odpovědi na antigen) myších, nebo lidských nádorových štěpů implantovaných do imunodeprivovaných (neschopných imunologické odpovědi na antigen) myši. Při studiu molekulární podstaty metastazování jsou využívány třeba tyto modelové systémy: 1. buněčná linie prsního myšního karcinomu aplikovaná do prsní tkáně imunokompetentní myši, přičemž je hodnoceno vytváření metastáz (např. v játrech, lymfatických uzlinách a plicích) [39]; 2. buněčná linie lidského prsního karcinomu aplikovaná do prsní tkáně imunodeficientní myši, přičemž je hodnoceno vytváření metastáz [40]; 3. lidská buněčná linie karcinomu prostaty aplikovaná do prostaty imunodeficientní myši s následným hodnocením tvorby metastáz [41]. K makroskopickému hodnocení vzniku a rozvoje vzniklých metastáz se využívají různé metody *in vivo* zobrazování, např. magnetická rezonance, pozitronová emisní tomografie, počítačová tomografie, chemiluminiscenční a fluorescenční zobrazování i další.

Závěr

Ke studiu buněčné migrace a invazivity je využívána řada *in vitro* a *in vivo* metod. Tyto techniky jsou vhodný nástroj pro výzkum široké škály biologických procesů, a zejména pak pro studium molekulární podstaty rozvoje nádorových onemocnění. Lze tedy očekávat, že aplikace a další rozvoj těchto technik přinese nové významné poznatky vedoucí k novým terapeutickým a diagnostickým přístupům zlepšujícím léčbu nádorových onemocnění.

Literatura

1. Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Cell migration: an overview. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 1–24. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_1.
2. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; 147(2): 275–292. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024.

3. Patel LR, Camacho DF, Shiozawa Y et al. Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future Oncol* 2011; 7(11): 1285–1297. doi: 10.2217/fon.11.112.
4. Penet MF, Chen Z, Bhujwalla ZM. MRI of metastasis permissive microenvironments. *Future Oncol* 2011; 7(11): 1269–1284. doi: 10.2217/fon.11.114.
5. Maryáš J, Faktor J, Dvořáková M et al. Proteomics in investigation of cancer metastasis: Functional and clinical consequences and methodological challenges. *Proteomics* 2014; 14(4–5): 426–440. doi: 10.1002/pmic.201300264.
6. Faktor J, Dvorakova M, Maryas J et al. Identification and characterization of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technology. *Klin Onkol* 2012; 25 (Suppl 2): 2570–2577.
7. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 2010; 10(9): 1886–1890. doi: 10.1002/pmic.200900758.
8. Cory G. Scratch-wound assay. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 25–30. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_2.
9. Magdalena J, Millard TH, Etienne-Manneville S et al. Involvement of the Arp2/3 Complex and Scar2 in Golgi Polarity in scratch wound models. *Mol Biol Cell* 2003; 14(2): 670–684.
10. Eccles SA, Box C, Court W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Bio-technol Annu Rev* 2005; 11: 391–421.
11. Knopfová L. Funkce proteinu c-Myb ve vybraných aspektech kancerogeneze. *Informační listy GSGM* 2013; 41: 37–50.
12. Fram TS, Wells CM, Jones GE. HGF-induced DU145 cell scatter assay. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 31–40. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_3.
13. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 442–454.
14. Cooper CR, Pienta KJ. Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2000; 3(1): 6–12.
15. Zicha D, Dunn GA, Brown AS. A new direct-viewing chemotaxis chamber. *J Cell Sci* 1991; 9(Pt 4): 769–775.
16. Kassir J, Lauffenburger DA, Turner T et al. Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Semin Cancer Biol* 2001; 11(2): 105–117.
17. Zantl R, Horn E. Chemotaxis of slow migrating mammalian cells analysed by video microscopy. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 191–203. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_13.
18. Le Y, Zhou Y, Iribarren P et al. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol* 2004; 1(2): 95–104.
19. Theveneau E, Mayor R. Beads on the run: beads as alternative tools for chemotaxis assays. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 449–460. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_30.
20. Falasca M, Raimondi C, Maffucci T. Boyden chamber. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 87–95. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_7.
21. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453–466.
22. Marshall J. Transwell® invasion assays. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 97–110. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_8.
23. Limame R, Wouters A, Pauwels B et al. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* 2012; 7(10): e46536. doi: 10.1371/journal.pone.0046536.
24. Aceabio.com [homepage on the Internet]. CA: Acea Biosciences, Inc.; c2014 [cited 2014 January 25]. Available from: http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=184.
25. Bird C, Kirstein S. Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system. *Nature Methods* 2009; 6: v-vi.
26. RTCA DP Instrument Operator's Manual. Germany: Roche Diagnostics 2009.
27. Cain RJ, Borda d'Água B, Ridley AJ. Quantification of transendothelial migration using three-dimensional confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 167–190. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_12.
28. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010; 188(1): 11–19.
29. Heuzé ML, Collin O, Terriac E et al. Cell migration in confinement: a micro-channel-based assay. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 415–434. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_28.
30. Artemenko Y, Swaney KF, Devreotes PN. Assessment of development and chemotaxis in *Dictyostelium discoideum* mutants. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 287–309. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_20.
31. Wong M, Martynovsky M, Schwarzbauer JE. Analysis of cell migration using *Ceanorhabditis elegans* as a model system. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 233–248. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_16.
32. Stramer B, Wood W. Inflammation and wound healing in *Drosophila*. *Methods Mol Biol* 2009; 571: 137–149. doi: 10.1007/978-1-60761-198-1_9.
33. Xu T, Rubin TM. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 1993; 117(4): 1223–1237.
34. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007; 8(5): 353–367.
35. Elks PM, Loynes CA, Renshaw SA. Measuring inflammatory cell migration in the zebrafish. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 261–275. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_18.
36. Box GM, Eccles SA. Simple experimental and spontaneous metastatic assays in mice. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 311–329. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_21.
37. Lu J, Steeg PS, Price JE et al. Breast cancer metastasis: challenges an opportunities. *Cancer Res* 2009; 69(12): 4951–4953. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0099.
38. Talmadge JE. Models of metastasis in drug discovery. *Methods Mol Biol* 2010; 602: 215–233. doi: 10.1007/978-1-60761-058-8_13.
39. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992; 52(6): 1399–1405.
40. Price JE, Polyzos A, Zhang RD et al. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* 1990; 50(3): 717–721.
41. Havens AM, Pedersen EA, Shiozawa Y et al. An *in vivo* mouse model for human prostate cancer metastasis. *Neoplasia* 2008; 10(4): 371–380.

Možnosti studia transendoteliální migrace *in vitro*

Techniques to Study Transendothelial Migration *In Vitro*

Knopfová L.¹, Bouchal P.², Šmarda J.¹

¹ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

² Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Nejzávažnější komplikací nádorových onemocnění je vznik vzdálených metastáz. K šíření do vzdálených orgánů využívají nádorové buňky často krevní cirkulaci. Vstup do krevního oběhu a průchod stěnou kapiláry do cílového sekundárního místa umožňují kolonizaci jiných orgánů a vznik život ohrožujících metastáz. Průchod stěnou cévy (transendoteliální migrace) je zásadní krok metastatické kaskády a poznání mechanismů řídících tento proces by jistě přispělo k vytváření nových strategií pro cílenou proti-metastatickou terapii. Existuje několik způsobů, jak studovat transendoteliální migraci v živých modelových organizmech (*in vivo*). Jejich výhodou je, že poskytují komplexní fyziologické mikroprostředí, jsou ale nákladné a technicky náročné. Proto se používají stále dokonalejší techniky pro sledování transendoteliální migrace *in vitro*. Jsou obecně dostupnější a méně náročné na vybavení, ale i v rámci metod studia transendoteliální migrace *in vitro* existuje značná variabilita ve složitosti provedení, požadavcích na speciální přístrojové vybavení, přesnosti simulace podmínek *in vivo* a v relevanci pro onkologické aplikace. Technické přístupy ke studiu transendoteliální migrace *in vitro*, jejich rozdělení, modifikace, výhody a nevýhody jsou předmětem tohoto přehledového článku.

Klíčová slova

transendoteliální migrace – extravazace – endoteliální buňky – metastáza – transwell systém

Summary

The most dangerous aspect of cancer is the metastatic spread to other parts of the body. Cancer cells frequently use circulation to spread to secondary locations. By entering the bloodstream (in a process called intravasation) and by crossing the vessel walls at the metastatic sites (extravasation) tumor cells disseminate to distal organs and eventually form life-threatening metastases. Crossing the vessel walls (transendothelial migration) is a vital step of metastatic cascade and the elucidation of mechanisms involved in transendothelial migration might inspire new strategies of targeted anti-metastatic therapy. There are several methods to study transendothelial migration in living models (*in vivo*). Although they offer complex physiological microenvironment, they are expensive and technically demanding, therefore not widely used. As an alternative, sophisticated techniques to investigate transendothelial migration *in vitro* have been developed. They are generally more available and feasible, but there is still considerable variability in the difficulty of performance, the requirements for specialized devices, accuracy of *in vivo* simulation and relevance for oncological applications. The classification, various modifications, pros and cons of *in vitro* techniques for studying transendothelial migration are summarized in this review.

Key words

transendothelial migration – extravasation – endothelial cells – metastasis – transwell system

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVPI – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Lucia Knopfová, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta MU

Kotlářská 2

611 37 Brno

e-mail: knopfova@sci.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 2. 2014

Přijato/Accepted: 27. 3. 2014

Úvod

Transendoteliální migrace (diapedéza) je proces průchodu buněk přes endotel. Může vést oběma směry: buňka může směřovat z lumen cévy/kapiláry do parenchymu cílového orgánu (extravazace), nebo naopak vstupovat ze subendoteliální tkáně do cirkulace (intravazace). Fyziologicky k ní dochází např. během zánětu, kdy leukocyty přitahované prozánětlivými molekulami vystupují z krevního řečiště do poškozené tkáně. U nádorových onemocnění dochází k interakci s endotelem během angiogeneze a metastatického šíření nádoru. Do míst vzdálených primárnímu tumoru jsou nádorové buňky často distribuovány krevním systémem, což předpokládá dvojí průnik nádorových buněk endoteliální bariérou. Invazivní buňky unikají z tkáně primárního karcinomu do krevního řečiště, přežívají jako cirkulující nádorové buňky, v cílovém místě prostupují stěnou kapiláry a v novém mikroprostředí mohou přežívat ve stavu dormance, případně dát vznik sekundárnímu nádoru [1].

Molekulární mechanismy řídící interakci nádorových buněk s endotelem jsou tedy s ohledem na potenciální terapeutické využití a prevenci metastatického rozsevu předmětem intenzivního výzkumu. Zkoumání transendoteliální migrace (TEM) *in vivo* je znesnadněno tím, že se jedná o proces probíhající uvnitř tkání organismu, v komplexním mikroprostředí a často v obtížně predikovatelných místech [2]. Nicméně pro studium intravazace lze využít zobrazovací techniky intravitální mikroskopie, extravazaci *in vivo* je možné hodnotit z hlediska účinnosti na úrovni buněčných populací podle přítomnosti značených buněk v parenchymu cílových orgánů [3–5]. Nedostatky těchto strategií, jako jsou špatné prostorové rozlišení intravitální mikroskopie, nákladnost, nutnost použití modelových zvířat a jejich výběr, vyvažuje komplexní fyziologické mikroprostředí TEM. Alternativu těmto přístupům *in vivo* nabízejí systémy pro sledování TEM *in vitro*, jejichž rozdělení a popis je předmětem tohoto přehledového článku.

Možnosti studia transendoteliální migrace *in vitro*

Techniky pro studium TEM *in vitro* lze rozdělit podle substrátu, na němž se for-

muje vrstva endoteliálních buněk (endotelial cell – EC). Některé techniky využívají tzv. transwell systém, kdy EC pokrývají porézní polyesterovou nebo polykarbonátovou membránu, jiné zajišťují 3D kulturační podmínky, obvykle reprezentované 3D kolagenovým gelem převrstveným endoteliálními buňkami. Podle způsobu monitorování TEM *in vitro* se rozlišují metody mikroskopické a nemikroskopické. Mikroskopické i nemikroskopické metody sledování TEM můžeme dále rozdělit na ty, které analyzují jeden (konečný) časový bod procesu, a na ty, které umožňují zaznamenávat TEM v reálném čase (časosběrná mikroskopie nebo monitorování změn impedance). Podle dalšího kritéria se rozlišují statické systémy TEM *in vitro*, systémy fluidní a třepací („rocking“) [6–8]. Níže budou popsány jednotlivé techniky studia TEM *in vitro* a jejich modifikace.

Statické systémy

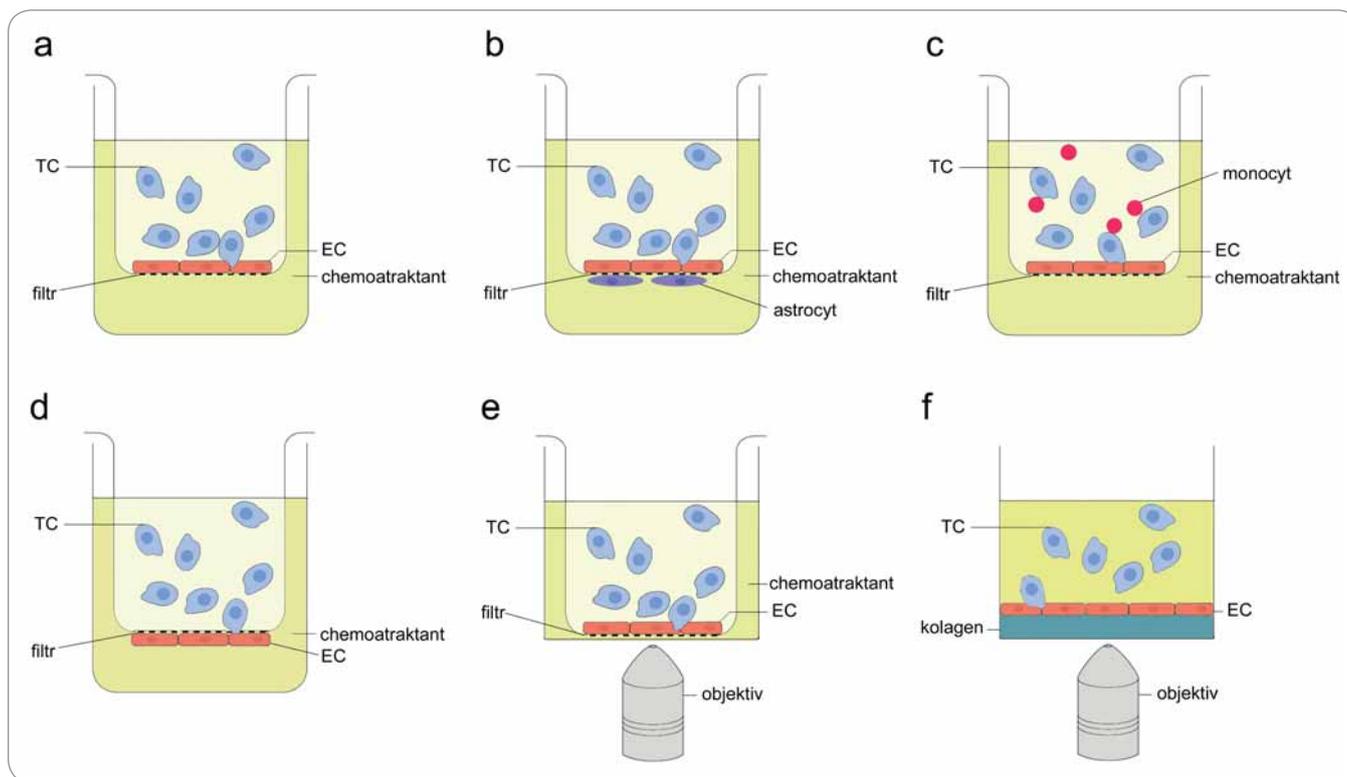
Transwell techniky pro sledování transendoteliální migrace

Základní transwell systém pro sledování TEM (obr. 1A) sestává z dvoukomorové kulturační jamky přehrazené porézním filtrem (velikost pórů obvykle 5–8 μm) [9–11]. Na horní stranu filtru jsou nasazeny EC, přitom adhezivní vlastnosti membrány jsou obvykle zlepšeny předchozím ošetřením roztoky obsahujícími složky extracelulární matrix (ECM), jako jsou fibronektin, vitronektin, kolagen, matrigel nebo želatina, za vzniku tenké vrstvy ECM [5,9,12,13]. Používají se různé typy EC: komerčně dostupné lidské EC z pupečnickové žíly (HUVEC) [10,14], primární lidské mikrovaskulární EC z různých orgánů [11,15], EC z aorty (HAEC) [16], imortalizovaná linie myších EC z pankreatu (MS1) [17], primární myší mikrovaskulární EC izolované z různých orgánů [5,8]. Jakmile EC zaplní plochu membrány a dosáhnou konfluence, což lze ověřit testem na permeabilitu EC pomocí dextranu konjugovaného s fluoroforem nebo měřením transendoteliální elektrické rezistence (TEER) [18,19], přidají se do horní části nádorové buňky. Spodní část jamky je naplněna médiem s chemoatraktantem podporujícím vstup nádorových buněk vrstvou endotelu a membránou. TEM se obvykle

vyhodnocuje 4–24 hodin po přidání nádorových buněk (časový bod pro zastavení TEM je nutno stanovit empiricky pro každou kombinaci buněčných linií) [9,12,14,20]. Hodnotí se přítomnost nádorových buněk na spodní straně membrány, případně ve spodní části transwell jamky [5,9]. Četnost buněk se posuzuje vizuálně po fixaci, případně po barvení (pokud nejsou označeny předem) [12,14,21], nebo se kvantifikace provádí fluorimetricky, event. průtokovou cytometrií při značení buněk fluorescenčními sondami [13,20,22]. Toto vychází uspořádání transwell experimentu je snadno sestavitelné, nevyžaduje speciální vybavení, umožňuje kvantifikaci, ale nenabízí možnost pozorovat jednotlivé fáze TEM.

Používají se proto i různé modifikace tohoto přístupu vyvažující některé nedostatky. Jako alternativní způsob hodnocení TEM (k „end-point“ detekci) lze použít odečítání změn impedance na spodní straně membrány transwell jamky. Kromě přístrojového vybavení (např. xCELLigence real time cell analyzer) jsou k tomu nezbytné speciálně upravené transwell jamky (CIM-plates) obsahující mikroelektrody na spodní straně membrány. Nádorové buňky procházející vrstvou EC a póry v membráně se dostávají do kontaktu s mikroelektrodami. Jejich přítomnost způsobuje změnu impedance a ta se odečítá v libovolných časových intervalech. Poměrně k počtu transmigrujících buněk narůstá v čase buněčný index odpovídající změně impedance, což umožňuje monitorování TEM v reálném čase (Knopfová et al, dosud nepublikováno). Pro rozlišení signálu generovaného samotnými EC je nutno jako kontrolu měřit impedanci v jamkách, do kterých nebyly přidány nádorové buňky.

Další možnost, jak zachytit dynamiku interakce nádorových a endoteliálních buněk během TEM na transwell membránách, nabízí mikroskopie. Inzerty s membránami (horní část transwell jamky) pokrytými EC jsou po přidání suspenze označených nádorových buněk položeny na misky se skleněným dnem (obr. 1E). Během inkubace ve vyhřívané komoře mikroskopu jsou v pravidelných intervalech snímány buňky v růz-



Obr. 1. Schematické znázornění statických systémů pro detekci TEM.

A. Základní složky transwell systému TEM; B. transwell model krevně-mozkové bariéry; C. modifikace transwell metodiky: TEM v přítomnosti krevních buněk; D. transwell model pro studium intravazace *in vitro*; E. transwell inzert v misce se skleněným dnem pro mikroskopickou detekci TEM; F. 3D model TEM.

TC – nádorová buňka, EC – endoteliální buňka

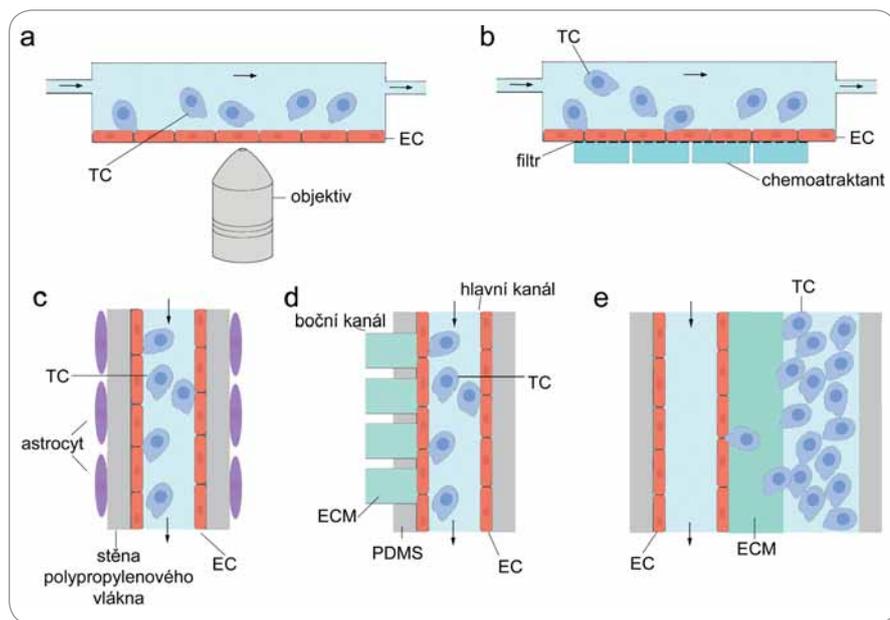
ných rovinách vzorku (nad membránou, v úrovni membrány i pod ní) [23]. Tento přístup dovoluje zachytit buňky v jednotlivých krocích během migrace přes endotel a membránu i sekvenci těchto kroků. Takto bylo zjištěno, že mezenchymální kmenové buňky procházejí mezi EC (nikoli skrz EC) dočasně vytvořenými mezerami, které se nad transmigrující buňkou zacelují [23]. Zobrazovací techniky se však potýkají se špatnými optickými vlastnostmi transwell membrány, zajištění dostatečného rozlišení vyžaduje velmi nákladné vybavení (konfokální mikroskop pro snímání živých buněk a objektiv s dlouhou pracovní vzdáleností).

Transwell systém lze modifikovat pro speciální účely, např. pro simulaci krevně-mozkové bariéry (obr. 1B). Malin et al. uzpůsobili transwell uspořádání pro kokultivaci EC a astrocytů – na spodní část transwell membrány aplikovali primární lidské astrocyty, po je-

jich přisednutí inzert obrátili a do horní části nasadili linii lidských mikrovaskulárních EC z mozku (HBMEC) [11]. Podobně jako při výchozích transwell testech byly po dosažení konfluencie EC ke kokultuře přidány značené nádorové buňky a po čase vyhodnocena jejich přítomnost na spodní části inzertu [11]. Jednodušší verze pokusu vynechává kultivaci astrocytů pod vrstvou EC a pro napodobení krevně-mozkové bariéry se bazální pól primárních EC z mozku vystavuje médiu, v němž byly astrocyty kultivovány [19], případně se astrocyty nasadí na dno spodní části transwell jamky [24]. Faktory sekretované astrocyty podporují utěsnění adhezivních spojů mezi EC [19].

Obrácené pořadí jednotlivých vrstev v transwell testech TEM lze využít pro modelování intravazace (obr. 1D). V klasické transwell sestavě přicházejí nádorové buňky nejdříve do kontaktu s apikální (luminální) stranou EC, poté

procházejí skrz subendoteliální ECM a membránu. Toto uspořádání simuluje extravazaci *in vivo*, kdy nádorové buňky opouští lumen cévy, interagují s EC a následně s bazální membránou obklopující cévu. Protože schopnost extravazace a intravazace nejsou funkčně ekvivalentní [1], používá se pro testování intravazace *in vitro* transwell inzert, jehož spodní strana je upravena tenkou vrstvou ECM a překryta EC [10]. Po inkubaci nutné k získání celistvé vrstvy EC se inzert obrátí a horní část se naplní suspenzí nádorových buněk. Spodní část slouží jako rezervoár kultivačního média s chemoatraktantem, případně s jinými testovanými látkami. Takto vstupují nádorové buňky nejdříve do kontaktu se subendoteliální vrstvou ECM a s bazálním pólem EC [10]. Orientace nádorových a endoteliálních buněk tak odpovídá situaci *in vivo* během intravazace, kdy izolovaná buňka nádoru vniká z extraluminálního prostoru do cirkulace.



Obr. 2. Schematické znázornění fluidních systémů pro detekci TEM.

A. Paralelní fluidní model, boční pohled; B. transwell průtokový systém, boční pohled; C. kapilární fluidní model krevně-mozkové bariéry, pohled shora; D. kapilární mikrofluidní zařízení pro sledování extravazace, pohled shora; E. kapilární mikrofluidní systém pro sledování intravazace, pohled shora.

TC – nádorová buňka, EC – endoteliální buňka, PDMS – polydimetylsiloxan, ECM – extracelulární matrix

Kromě astrocytů mohou být tradiční transwell TEM experimenty obohaceny dalším typem buněk, monocytů [5]. Bylo prokázáno, že myeloidní buňky se aktivně účastní TEM a diseminace nádorů *in vivo* [5,25,26]. Přítomnost leukocytů v kokultuře nádorových a endoteliálních buněk přispívá k simulaci fyziologicky relevantních podmínek extravazace. Postup i složky transwell experimentu zůstávají stejné, jen se do horní části jamky k suspenzi nádorových buněk přidá pětinašobné množství monocytů (obr. 1C). Tato varianta transwell systému pomáhá lépe odhadovat metastatickou aktivitu buněk *in vivo*. Například nádorové buňky MC-38 neschopné za normálních podmínek migrovat vrstvou primárních EC procházejí endotelem v přítomnosti primárních monocytů izolovaných z kostní dřeně myši [5].

Trojrozměrné modely transendoteliální migrace *in vitro*

Zatímco transwell systémy se pro svou jednoduchost hojně používají pro kvantifikaci TEM *in vitro*, nefyziologická bariéra, jakou je porézní membrána, kom-

plikuje získání informací o morfologii buněk, organizaci biomembránových struktur a/nebo mezibuněčných kontaktů během jednotlivých fází TEM [27]. Deformaci buněk během průchodu transwell membránou je možno předejít použitím trojrozměrných gelů jako substrátů pro formování monovrstvy EC [27,28] (obr. 1F). Jako 3D fibrilární matrix se obvykle používá extrakt bazální membrány (matrigel) [15] nebo kolagen typu I [22,28], který v neutrálním pH a při teplotě 37 °C tuhne za vzniku průsvitné gelové struktury, jejíž pevnost je dána koncentrací kolagenu. Tloušťka gelu limituje rozlišení, pro vyšší rozlišení (63–100× objektiv) jsou nezbytné gely tenčí než 100 μm [28]. Roztok kolagenu nebo matrigelu se aplikuje na kultivační misku se skleněným dnem, po ztuhnutí se povrch gelu může ještě upravit fibronectinem a na něj se v požadované hustotě nasadí EC [29]. Růst EC lze snadno vizuálně kontrolovat. Ke konfluentním buňkám se přidá suspenze značených testovaných buněk. Ke značení se používají fluorescenční sondy permeabilní pro membránu živých buněk,

jako je CellTrace™, CellTracker™, Calcein AM, karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl ester CFSE, případně transfekce plazmidy kódujícími fluorescenční proteiny [15,22,28]. Je možné takto označit také specifické buněčné struktury, např. F-actin pomocí LifeAct peptidu konjugovaného s fluorescenční značkou, a sledovat tak dynamickou distribuci cílového proteinu během TEM [28].

Vyhodnocení TEM spočívá ve snímání několika rovin kokultury (nad i pod úrovní EC) konfokálním mikroskopem a následné analýze obrazu, která umožňuje i jistou míru kvantifikace. Pro porovnání míry TEM se stanoví četnost buněk nad a pod vrstvou EC [22]. Kromě účinnosti TEM se dají sledovat další parametry, jako je polarizace buněk, forma diapedézy (transcelulární nebo paracelulární), formování membránových struktur a jiné [30]. Videomikroskopicky lze snímat jedno místo vzorku v čase, nebo lze buňky v požadovaném časovém intervalu fixovat a použitím specifických protilátek určit subcelulární distribuci a/nebo kolokalizaci sledovaných proteinů [22,28]. S použitím 3D modelu TEM se podařilo zachytit dramatické změny tvaru transmigrujících buněk doprovázené reorganizací aktinového cytoskeletu a charakterizovat stadia extravazace *in vitro* [15].

Fluidní systémy

Paralelní průtokové modely

Oba popsané modely (transwell i 3D) patří do skupiny statických systémů pro sledování TEM *in vitro*. To znamená, že v nich nedochází k proudění tekutiny, která by simulovala cirkulaci krve uvnitř cév. Proudění nosné tekutiny a tzv. smykové napětí (shear stress) nicméně významně ovlivňují morfologické i funkční charakteristiky EC, adhezi cirkulujících nádorových buněk ke stěně cévy a transmigraci [31]. Proto byly vytvořeny fluidní systémy pro výzkum TEM.

Nejjednodušší fluidní systém se skládá z kultivační komůrky s otvory pro přítok a odtok média (parallel-plate flow chamber) [13] (obr. 2A). Na dno průtokové komůrky se vkládá sklo (předem ošetřené některou složkou ECM) pokryté vrstvou EC. Do komůrky je pumpou vtláčováno médium (rychlost proudění je re-

gulována), do něj se přidá studovaná buněčná populace a mikroskopicky se hodnotí adheze k EC při různé vysokém smykovém napětí (0,5–40 dyn/cm², fyziologický rozsah v mikrovaskulatuře 0,5–5 dyn/cm², ve velkých cévách 10–40 dyn/cm²) [13,16,32,33].

I fluidní systémy poskytují prostor pro obohacení kokultury EC a nádorových buněk o další buněčné typy. Začlenění monocytů do průtokových modelů TEM se ukazuje jako výhoda při snaze předvídat chování buněk *in vivo*. Například metastatické buňky prsního karcinomu (linie MDA-MB-231) interagují v průtokových podmínkách s endotelem *in vitro* výhradně v přítomnosti monocytů, s nimiž tvoří stabilní agregáty [16]. Monocyty takto asistují nádorovým buňkám vystaveným hemodynamickému působení při zachycení na vrstvě EC [16].

Transwell průtokový model

S podobným výsledkem byla testována TEM buněk melanomu v přítomnosti krevních buněk [34,35]. Kromě fluidního modelu popsaného výše použili Dong et al transwell kulturační systém adaptovaný pro průtokové podmínky – porézní membrána tvoří substrát pro EC, prostor pod membránou slouží jako zásobárna chemoatraktantu, prostor nad membránou je uzavřen a otvory v horní části se vhání a odtéká médium se suspenzí nádorových a krevních buněk (obr. 2B) [34]. Tento transwell fluidní systém umožňuje sledovat migraci skrz vrstvu EC, zatímco paralelní průtokový systém zaznamenává adhezi nádorových buněk k EC a interkalaci. TEM buněk melanomu je v průtokových podmínkách ve srovnání se statickými podmínkami zhoršena, nicméně ji významně stimuluje interakce s krevními neutrofilii [34,35].

Kapilární průtokové modely

Fluidní systém, který by sloužil jako model krevně-mozkové bariéry *in vitro*, navrhli Cucullo et al [32,36]. Trojrozměrný průtokový model, jenž zahrnuje luminální působení smykového napětí na mozkové EC i abluminální vliv astrocytů, umožňuje reprodukovat fyziologické a biochemické vlastnosti intaktní krevně-mozkové bariéry (obr. 2C) [36]. Nosnou konstrukci původního modelu

tvoří polypropylenové duté vlákno vložené do uzavřené komůrky s otvory pro přísun a odtok média a se skleněným dnem. Dvnitř vlákna jsou injikovány EC tak, aby po přisednutí a dělení tvořily výstelku dutiny. Do extraluminálního prostoru jsou aplikovány astrocyty, které pak pokrývají vlákno z vnější strany. Do vlákna je pumpou vtláčováno médium a silikonové trubice zajišťují výměnu CO₂/O₂. Vnitřní průměr vlákna je asi 600 μm a tloušťka stěny 200 μm. Průměr pórů ve stěně vlákna může být až 4 μm, což umožňuje extravazaci buněk z lumen kapiláry [32]. Výhoda tohoto dynamického systému je zajištění kontrolovaného 3D růstu buněčných složek krevně-mozkové bariéry v průtokovém systému umělých kapilár. Pro výzkum TEM nádorových buněk nebyl tento model dosud významně využíván.

Propracovaný mikrofluidní model TEM, který zahrnuje všechny základní složky mikroprostředí krevní kapiláry *in vivo* (dutinu s výstelkou EC, proudění média a smykové napětí, perivaskulární 3D ECM), vytvořili Zhang et al [6]. Mikrofluidní zařízení představuje skleněná podložka pokrytá vrstvou polydimetylsiloxanu, průsvitným organickým polymerem s vysokou propustností pro plyny. V něm je vytvořena soustava kanálků – hlavní kanál s otvory pro přítok a odtok média, do něhož kolmo ústí několik bočních kanálků (obr. 2D). Tyto jsou následně až po ústí do hlavního kanálu naplněny matrigelem (nebo jiným hydrogelem simulujícím ECM) a slouží jako perivaskulární matrix. Hlavní kanál je po všech stranách vystlán EC, proudí jím médium a simuluje dutinu cévy. TEM je monitorována v místě, kde boční kanálky ústí do hlavního. Tam nádorové buňky (označené fluorescenční sondou) aplikované do média nemusejí překonávat žádné umělé bariéry a vstupují do kontaktu pouze s (jinak fluorescenčně značenými) EC a subendoteliální ECM. V matrix bočních kanálků je navíc možno vytvořit gradient libovolných chemoatraktantů a zkoumat tak jejich vliv na účinnost TEM [6]. Podobný design mikrofluidního systému, kdy nádorové buňky unášené proudem média interagují s EC a migrují skrz ně do 3D matrix tvořené kolagenem typu I, využili Jeon et al pro mode-

lování extravazace *in vitro* [7]. Přejech z dutiny kanálu vytvořeného v polydimetylsiloxanu přes vrstvu EC do hydrogelu v bočním kanálku podstoupí 39 % injikovaných nádorových buněk linie MDA-MB-231 během prvních 24 hodin [7].

Pro sledování intravazace za fluidních podmínek v 3D mikroprostředí existuje speciální systém, který reprodukuje rozhraní mezi primárním nádorem a endotelem a umožňuje mikroskopii v reálném čase a ve vysokém rozlišení [37]. Systém dvou paralelních mikrokanálků, jež jsou propojeny vrstvou kolagenového gelu, dovoluje nezávislé nasazení endoteliálních a nádorových buněk (obr. 2E). EC formují uvnitř kanálu dutou 3D kapilární strukturu, nádorové buňky invadují hydrogel, narážejí na bazální stranu EC a transmigrují do dutiny paralelního kanálku. Systém umožňuje regulovat průtok, obohacovat mikroprostředí dalšími buněčnými typy, např. makrofágy, vytvářet koncentrační gradient testovaných látek a napodobovat tak situaci doprovázející intravazaci *in vivo* [37]. Takto se podařilo prokázat, že endotel funguje jako bariéra v migraci nádorových buněk, jejíž permeabilita může být modulována faktory sekretovanými primárním nádorem [37].

Třepací („rocking“) systém pro analýzu transendoteliální migrace

Protože fluidní modely často vyžadují speciální vybavení a nejsou snadno dostupné, navrhli Bapu et al nahradit jednosměrný proud tekutiny obousměrným, který by v kulturačních nádobkách vznikl kýváním nebo třepáním [8]. Jejich model umožňuje mikroskopicky hodnotit míru adheze nádorových buněk k EC rostoucím v monovrstvě na skleněném povrchu [8]. Usuzujeme, že podobného efektu se stejnými výhodami by se docílilo s použitím transwell jamek vystavených po dobu dvou a více hodin kývání, a tedy proudění média.

Závěr

Existuje řada metodických přístupů ke studiu TEM *in vitro*. Transwell systémy jsou upřednostňovány pro jednoduchost a dostupnost při prvotních odhadech míry TEM různých typů buněk,

nebo za působení širokého spektra různých látek. Složitější statické modely jsou nezbytné pro zachycení dynamiky TEM, případně pro identifikaci fáze procesu, která byla zasažena za testovaných podmínek. Fluidní systémy, zejména kapilární, zlepšují *in vitro* možnosti rekapitulace komplexních fyziologických podmínek *in vivo*, a tím pomáhají lépe odhadovat výsledky experimentálních zásahů v živém organismu. Stále dokonalejší techniky pro detekci TEM *in vitro* reprezentují nezbytnou alternativu k postupům *in vivo*, jež nabízejí výsledky relevantní pro klinické aplikace, ale nejsou pro svou nákladnost a experimentální náročnost vždy dostupné. Protože interakce nádorových buněk a endotelu determinují úspěšnost nádorové diseminace, představují potenciální cíl proti-metastatické terapie a mechanismy regulující TEM jsou tak významným tématem onkologického výzkumu.

Literatura

1. Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(12): 858–870. doi: 10.1038/nrc3628.
2. Stoletov K, Kato H, Zardoujian E et al. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 13): 2332–2341. doi: 10.1242/jcs.069443.
3. Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS et al. A critical step in metastasis: *in vivo* analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 2000; 60(9): 2504–2511.
4. Gligorijevic B, Wyckoff J, Yamaguchi H et al. N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 3): 724–734. doi: 10.1242/jcs.092726.
5. Wolf MJ, Hoos A, Bauer J et al. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell* 2012; 22(1): 91–105. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.023.
6. Zhang Q, Liu T, Qin J. A microfluidic-based device for study of transendothelial invasion of tumor aggregates in realtime. *Lab Chip* 2012; 12(16): 2837–2842. doi: 10.1039/c2lc00030j.
7. Jeon JS, Zervantonakis IK, Chung S et al. *In vitro* model of tumor cell extravasation. *PLoS One* 2013; 8(2): e56910. doi: 10.1371/journal.pone.0056910.
8. Bapu D, Khadim M, Brooks SA. Rocking adhesion assay system to study adhesion and transendothelial migration of cancer cells. *Methods Mol Biol* 2014; 1070: 37–45. doi: 10.1007/978-1-4614-8244-4_3.
9. Zen K, Liu DQ, Guo YL et al. CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS One* 2008; 3(3): e1826. doi: 10.1371/journal.pone.0001826.
10. Peyri N, Berard M, Fauvel-Lafeve F et al. Breast tumor cells transendothelial migration induces endothelial cell anoikis through extracellular matrix degradation. *Anticancer Res* 2009; 29(6): 2347–2355.
11. Malin D, Strekalova E, Petrovic V et al. α B-crystallin: a novel regulator of breast cancer metastasis to the brain. *Clin Cancer Res* 2014; 20(1): 56–67. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1255.
12. Ma C, Rong Y, Radloff DR et al. Extracellular matrix protein betaig-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation. *Genes Dev* 2008; 22(3): 308–321. doi: 10.1101/gad.1632008.
13. Haddad O, Chotard-Ghodsnia R, Verdier C et al. Tumor cell/endothelial cell tight contact upregulates endothelial adhesion molecule expression mediated by NFkappaB: differential role of the shear stress. *Exp Cell Res* 2010; 316(4): 615–626. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.11.015.
14. Li J, Guillebon AD, Hsu JW et al. Human fucosyltransferase 6 enables prostate cancer metastasis to bone. *Br J Cancer* 2013; 109(12): 3014–3022. doi: 10.1038/bjc.2013.690.
15. Voura EB, English JL, Yu HY et al. Proteolysis during tumor cell extravasation *in vitro*: metalloproteinase involvement across tumor cell types. *PLoS One* 2013; 8(10): e78413. doi: 10.1371/journal.pone.0078413.
16. Evani SJ, Prabhu RG, Gnanaruban V et al. Monocytes mediate metastatic breast tumor cell adhesion to endothelium under flow. *FASEB J* 2013; 27(8): 3017–3029. doi: 10.1096/fj.12-224824.
17. Kim C, Lee HS, Lee D et al. Epithin/PRSS14 proteolytically regulates angiopoietin receptor Tie2 during transendothelial migration. *Blood* 2011; 117(4): 1415–1424. doi: 10.1182/blood-2010-03-275289.
18. Ma C, Wang XF. *In vitro* assays for the extracellular matrix protein-regulated extravasation process. *CSH Protoc* 2008. doi: 10.1101/pdb.prot5034.
19. Fazakas C, Wilhelm I, Nagyoszi P et al. Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One* 2011; 6(6): e20758. doi: 10.1371/journal.pone.0020758.
20. Haidari M, Zhang W, Wakame K. Disruption of endothelial adherens junction by invasive breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species and is attenuated by AHCC. *Life Sci* 2013; 93(25–26): 994–1003. doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.027.
21. Leroy-Dudal J, Demeilliers C, Gallet O et al. Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves α v integrins and the participation of MMP2. *Int J Cancer* 2005; 114(4): 531–543.
22. Reymond N, Im JH, Garg R et al. Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through β 1 integrin. *J Cell Biol* 2012; 199(4): 653–668. doi: 10.1083/jcb.201205169.
23. Matsushita T, Kibayashi T, Katayama T et al. Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci Lett* 2011; 502(1): 41–45. doi: 10.1016/j.neulet.2011.07.021.
24. Díaz-Coránguez M, Segovia J, López-Ornelas A et al. Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells. *PLoS One* 2013; 8(4): e60655. doi: 10.1371/journal.pone.0060655.
25. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010; 141(1): 39–51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
26. Hoos A, Protsyuk D, Borsig L. Metastatic growth progression caused by PSGL-1-mediated recruitment of monocytes to metastatic sites. *Cancer Res* 2014; 74(3): 695–704. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0946.
27. Cain RJ, d'Água BB, Ridley AJ. Quantification of transendothelial migration using three-dimensional confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 167–190. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_12.
28. Estecha A, Sánchez-Martín L, Puig-Kröger A et al. Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 19): 3492–3501. doi: 10.1242/jcs.053157.
29. Muller WA, Lusinskas FW. Assays of transendothelial migration *in vitro*. *Methods Enzymol* 2008; 443: 155–176. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02009-0.
30. Carman CV. High-resolution fluorescence microscopy to study transendothelial migration. *Methods Mol Biol* 2012; 757: 215–245. doi: 10.1007/978-1-61779-166-6_15.
31. Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A et al. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81(3): 177–199.
32. Cucullo L, Marchi N, Hossain M et al. A dynamic *in vitro* BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31(2): 767–777. doi: 10.1038/jcbfm.2010.162.
33. Adams Y, Rowe JA. The effect of anti-rosetting agents against malaria parasites under physiological flow conditions. *PLoS One* 2013; 8(9): e73999. doi: 10.1371/journal.pone.0073999.
34. Dong C, Slattery MJ, Liang S et al. Melanoma cell extravasation under flow conditions is modulated by leukocytes and endogenously produced interleukin 8. *Mol Cell Biomech* 2005; 2(3): 145–159.
35. Liang S, Slattery MJ, Wagner D et al. Hydrodynamic shear rate regulates melanoma-leukocyte aggregation, melanoma adhesion to the endothelium, and subsequent extravasation. *Ann Biomed Eng* 2008; 36(4): 661–671. doi: 10.1007/s10439-008-9445-8.
36. Cucullo L, McAllister MS, Kight K et al. A new dynamic *in vitro* model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier. *Brain Res* 2002; 951(2): 243–254.
37. Zervantonakis IK, Hughes-Alford SK, Charest JL et al. Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(34): 13515–13520. doi: 10.1073/pnas.1210182109.

Mechanizmy lékové rezistence a nádorové kmenové buňky

Mechanisms of Drug Resistance and Cancer Stem Cells

Holčáková J., Nekulová M., Orzol P., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Ačkoliv úspěšnost léčby nádorových onemocnění se každoročně zvyšuje, rezistence k léčivům je nadále hlavní příčina úmrtí pacientů s rakovinou. Počáteční léčba často zanechává „zbytkové“ (reziduální) onemocnění, které vede k opětovnému rozvoji nádoru, případně ke ztrátě jeho citlivosti k použité léčbě. Vznik reziduálního onemocnění je ovlivněn přítomností nádorových kmenových buněk (CSCs). Jedná se o malou populaci buněk schopných sebeobnovy a diferenciací. Předpokládá se, že tyto buňky jsou odpovědné za vznik, růst, metastazování a udržení nádoru a také za jeho lékovou rezistenci. V poslední době je velká pozornost věnována vývoji terapií zaměřených na eliminaci CSCs a na identifikaci klíčových molekul zapojených do kontroly vlastností charakteristických pro populaci CSCs. Tento článek shrnuje základní poznatky o mechanismech lékové rezistence ve vztahu k populaci nádorových kmenových buněk.

Klíčová slova

léková rezistence – nádorové kmenové buňky – membránové transportní proteiny – přeměna epitelové buňky na mezenchymovou – mikroprostředí nádoru – apoptóza

Summary

Although the success of anticancer treatments has been increasing annually, drug resistance remains the dominant cause of death of cancer patients. Initial therapy often leaves residual disease that leads to repeated tumor development or to loss of its sensitivity to available therapy. One reason of residual disease formation is the presence of cancer stem cells (CSCs). CSCs have been identified as a small population of cells that is capable of self-renewal and differentiation. It is supposed that these cells are responsible for cancer initiation, progression, metastasis, recurrence and drug resistance. Over the past years, much attention has been paid to development of CSCs-related therapies and to identification of key molecules involved in controlling the specific properties of CSCs populations. This article reviews the basic mechanisms of drug resistance in relation to cancer stem cells.

Key words

drug resistance – cancer stem cells – membrane transport proteins – epithelial-mesenchymal transition – tumor microenvironment – apoptosis

Tato práce byla realizována za podpory Interní grantové agentury MZ ČR IGA NT/14602 – 3/2013, Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by research program of the Internal Grant Agency, Ministry of Health of the Czech Republic: NT/14602 – 3/2013, by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Holčáková Jitka, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: holcakova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 2. 2014

Přijato/Accepted: 7. 5. 2014

Úvod

Rezistence nádorů k dostupné léčbě (chemorezistence) je jedna z hlavních příčin úmrtí pacientů s rakovinou. Většinou se chemorezistence vyvíjí ve dvou krocích. Nejprve nádor odpovídá na léčbu, ale ne všechny buňky jsou zničeny. Tyto rezistentní buňky mohou poté dát vznik sekundárním nádorům, které již neodpovídají na terapii. Na odolnosti buněk vůči léčbě se podílí mnoho faktorů, jako je snížené vstřebávání léčiv nebo naopak jejich zvýšený výdej, detoxikace, zvýšená intenzita oprav DNA či deregulace drah programované smrti buněk [1,2]. Příčinou chemorezistence u pevných nádorů může být i špatný přísun léčiv z důvodu slabé vaskularizace nádoru či nepropustnosti okolní tkáně. Uvedené mechanismy lékové rezistence se shodují s původními nebo získanými vlastnostmi charakteristickými pro nádorové kmenové buňky (cancer stem cells – CSCs): stagnace, specifická morfologie, zvýšená produkce antiapoptických proteinů, transmembránových přenašečů či detoxikačních enzymů. Předpokládá se, že právě tyto buňky odpovídají za lékovou rezistenci, metastazování a recidivu některých nádorů.

Současné strategie léčby proto zahrnují nejen překonávání fyzických bariér a mechanismů lékové rezistence nádorů, ale také se soustřeďují na cílené potlačení CSCs, aby se zabránilo návratu onemocnění [3].

Nejčastější mechanismy lékové rezistence

Mikroprostředí nádorů (nika)

Nádor je vysoce komplexní tkáň, kde jsou vlastní nádorové buňky většinou v menšině a koexistují s různými typy buněk v prostředí, které se významně liší od normální tkáně. Nádorové buňky jsou silně provázány s okolním prostředím, jež jim předává a poskytuje onkogenní signály podporující nádorovou progresi [4]. Součástí niky jsou stromální buňky, buňky imunitního systému, endoteliální buňky či pericyty. Převládající stromální buňky jsou fibroblasty, které uvolňují do prostředí komponenty extracelulární matrix, enzymy, růstové faktory, cytosiny a látky stimulující růst nádoru, angiogenezi a infiltraci buněk imunit-

ního systému [5,6]. Infiltrace imunitních buněk je významná pro některé typy nádorů, jako adenokarcinom mléčné žlázy a slinivky. Tyto s nádorem spolupracující makrofágy uvolňují růstové faktory, chemokiny, cytosiny či enzymy degradující matrix, které stimulují angiogenezi [7], růst nádorových buněk, invazivitu, příliv pronádorových imunitních buněk a naopak blokují aktivaci protinádorových T buněk [8]. Dalším příkladem jsou stromální buňky v okolí kostní dřene nebo sekundárních lymfoidních orgánů, jež podporují růst, proliferaci a chemorezistenci maligních B buněk a napomáhají tak průběhu onemocnění [9]. Nádorové buňky produkují proteolytické enzymy, zejména metaloproteinázy, které mají pro-migrační a pro-angiogenní vlastnosti, aktivují povrch buněk a faktory vážící se na extracelulární matrix (ECM). Příkladem je nadměrná produkce aktivovaných forem metaloproteináz u epitelu mléčné žlázy u myši, jež narušují spojitost kostní dřene, čímž vzniká reaktivní stroma a formují se geneticky nestabilní nádory mléčné žlázy [10]. Složení a uspořádání ECM a stromálních komponent přispívá k výraznému gradientu v koncentraci léků, zvyšuje mezibuněčný tlak kapalin a dochází k metabolickým změnám, což silně přispívá ke zvýšení chemorezistence nádorových buněk [11]. Podobně pomáhá přežívání maligních buněk slabě kyselá pH charakteristická pro okolí pevných nádorů, které snižuje průchod některých bazických chemoterapeutik difúzí přes plazmatickou membránu [12]. Nika obklopující nádor tak vytváří bariéru chránící nádor před účinkem léků. Současné studie ukazují, že enzymatickým narušením stromatu v okolí nádorů a odstraněním jejich ochranné bariéry dochází ke zvýšení vaskularizace a zlepšení účinnosti protinádorové léčby [3].

Chemorezistence navozená buněčnou adhezí (CAM-DR)

Pro růst a přežití normálních buněk je nezbytná adheze (přilnavost) k povrchu, naopak u nádorových buněk je nutná nezávislost na jejich ukotvení. Např. ztráta β 1-integrinu u nemaligních buněk vede k jejich apoptóze, zatímco u nádorových buněk bývá exprese

β 1-integrinu zcela potlačena nebo naopak dramaticky zvýšena. Adheze k ECM přes β 1-integriny u buněk mnohočetného myelomu zvyšuje růst nádoru a jeho rezistenci k léčivům jako doxorubicin a melfalan [13]. Zablokování vazby β 1-integrinu k ECM a stromálním buňkám dramaticky snižuje nádorové zatížení a zvyšuje přežití u myších modelů mnohočetného myelomu [14]. Podobně inhibice β 1-integrinu u xenograftů karcinomu mléčné žlázy vede k významnému zmenšení nádorů a zvýšení jejich citlivosti k ozařování [15]. Vazba nádorových buněk k ECM a stromálním buňkám přes β 1-integriny ovlivňuje buněčnou lokalizaci apoptotických regulátorů a kontroluje průběh buněčného cyklu u hematologických a epitelových malignit [16]. Hazlehurst et al popsali, že zástava buněčného cyklu v G1 fázi u buněk myelomu je způsobena vazbou β 1-integrinu na fibronektin, která koreluje se zvýšenou hladinou p27 a zvyšuje rezistenci buněk k etoposidu [17]. Vazba β 1-integrinu k ECM může silně ovlivnit proces rozpoznání a opravy poškozené DNA, kdy adheze nádorových buněk k ECM urychluje a optimalizuje opravy DNA po ozařování a zajišťuje tak stabilnější genom a přežití buněk. Komunikace buněk s EMC také ovlivňuje strukturu jejich jádra a uspořádání chromatinu [18,19].

Epiteliální-mezenchymální přeměna

Vliv prostředí nádoru se také podílí na procesu přeměny epiteliální buňky na mezenchymální (EMT). Jedná se o přechodnou změnu buněčného fenotypu, která zahrnuje nárůst fibroidní morfologie, invazivity, odolnosti k apoptóze a navýšení sekrece složek extracelulární matrix [20,21]. Postupně se rozvolňují mezibuněčné spoje, reorganizuje se cytoskelet, buňka ztrácí apikální polaritu a nakonec dochází k její přeměně na buňku s vřetenovitou morfologií [22]. Proces EMT u epitelu různých orgánů je jedním z prvních kroků při vzniku nádoru [23], souvisí s progresí nádoru, s metastazováním a s přítomností nádorových kmenových buněk. Zvýšená hladina markerů EMT je spojována s větší agresivitou nádorů a s jejich rezistencí k různým protinádorovým látkám.

Mechanismus EMT není znám, ale předpokládá se, že dochází k masivnímu „přeprogramování“ genové exprese buněk a k získání nových vlastností souvisejících s rezistencí k léčivům [24]. EMT je pravděpodobně indukována signály z okolního stromatu. Na její regulaci se podílejí růstové faktory jako HGF (hepatocyte growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF β (transforming growth factor beta), Slug a negativní regulátory ZEB1, 2 (zinc finger E-box binding homeobox 1, 2) či miR-200 [23]. EMT je také spojena se zvýšenou expresí transmembránových přenašečů a se změnou v opravných mechanismech DNA [25].

Hypoxie

Hypoxie je jedním ze znaků prostředí obklopujícího pevný nádor a je způsobena nerovnováhou mezi příjmem a spotřebou kyslíku. Přítomnost hypoxie u pevných nádorů je spojována s jejich rezistencí k radioterapii a chemoterapii, s vyšším nádorovým potenciálem buněk a horší prognózou onemocnění [26]. Hlavními regulátory buněčné adaptace k nedostatku kyslíku jsou HIFs (hypoxia inducible factors). Tyto transkripční faktory aktivují geny, které zabraňují buněčné diferenciaci, podporují formování cév, regulují glykolýzu, spotřebu kyslíku, apoptózu, migraci a metastazování [27]. HIFs aktivují enzymy pro opravu dvouřetězcových zlomů DNA a podporují vznik rezistence buněk k látkám poškozujícím DNA. Navíc hypoxie reguluje i angiogenezi, jednu z hnacích sil při vývoji nádoru. Hladina HIFs je regulována koncentrací kyslíku v buňce. Pokud je hladina kyslíku nízká, dochází ke stabilizaci HIFs, jejich translokaci do jádra a k aktivaci cílových genů. Expze HIFs byla zaznamenána u mnoha typů nádorů a je spojena se špatnou prognózou a odpovědí na léčbu. Preklinické studie potvrdily, že terapie zasahující HIFs (siRNA, inhibitory topoizomeráz) pomáhají překonávat lékovou rezistenci [28,29].

Transmembránové pumpy

Transmembránové pumpy jsou proteiny zajišťující transport širokého spektra látek přes extra- i intracelulární membrány za současné hydrolýzy ATP

(adenosine triphosphate) [30]. Velké množství těchto transportérů je zahrnuto do rodiny přenašečů vázajících ATP (ABC přenašeče). Tyto proteiny hrají důležitou úlohu v adsorpci, distribuci a eliminaci léčiv a nadměrná expze některých z nich vede ke vzniku lékové rezistence. Mezi nejčastěji diskutované proteiny přispívající k chemorezistenci patří P-gp (P-glycoprotein), MRP1, 2 (the multidrug resistance protein 1, 2) a BCRP (breast cancer resistance protein). Zvýšená produkce těchto proteinů vede k rychlejšímu exportu toxických látek z buňky a ke snížení intracelulární akumulace léčiv. Způsobují odolnost buněk k látkám jako taxany, antracykliny, epipodophyllotoxiny, metotrexát, analogy nukleotidů nebo alkylační látky [31,32].

Zablokování programované buněčné smrti

Účinek mnoha protinádorových léčiv je založen na aktivaci programované buněčné smrti (apoptóza). Nádorové buňky, které mají tyto proapoptotické signální dráhy poškozené nebo zablokované, jsou odolnější vůči těmto látkám a získávají čas na opravu poškozené DNA a dalších buněčných struktur. Mechanizmy rezistence k apoptóze zahrnují: 1. porušení rovnováhy mezi pro- a anti-apoptotickými proteiny, 2. snížení funkce kaspáz a 3. poruchy signálních drah receptorů smrti.

1. Proces apoptózy může být narušen nadměrnou produkcí anti-apoptotických genů (*BCL2*, *BCL-X_L*, *MCL-1*), snížením produkce pro-apoptotických genů (*BAX*, *PUMA*, *NOXA*), poškozením p53 či apoptotických signálních drah, deregulací inhibitorů apoptózy (IAPs-NAIP, c-IAP1, c-IAP2, X-linked IAP, Survivin, Apollon, Livin) nebo proteinů řídících buněčnou odpověď na stresové stimuly (heat shock proteiny – HSPs).

Nadměrná expze Bcl-2 je velmi často spojena se špatnou prognózou onemocnění a odolností vůči chemoterapii a radioterapii. Vysoká produkce Bcl-2 může být způsobena translokací chromozomů t(14, 18), amplifikací genu *BCL2* nebo delecí chromozomu, která má za následek ztrátu miRNA specifickou pro *BCL2*. Vedle nadměrné produkce anti-apopto-

tických proteinů nádorové buňky odolávají apoptóze potlačením expze nebo mutací pro-apoptotických genů. Příčinou může být ztráta funkce nádorových supresorů jako p53 a tím snížení expze jejich cílových genů a inaktivace apoptotických signálních drah [33].

IAPs jsou endogenní inhibitory kaspáz, které vazbou na aktivní místo kaspázy iniciují její degradaci nebo brání vazbě se substrátem a blokují spuštění apoptózy. Nadměrná produkce IAPs byla zaznamenána u mnoha typů nádorových onemocnění a bývá spjata se zvýšenou odolností onemocnění k chemoterapii a k podmínkám vyvolávajícím apoptózu [34].

HSPs – jsou produkovány jako odpověď na stres a zvyšují odolnost buňky vůči stresovým podmínkám. Za normálních podmínek zajišťují HSPs v buňce mnoho různých funkcí včetně řízení aktivity enzymů změnou jejich konformace, správné sbalování proteinů při translaci, regulaci tvorby proteinových komplexů, kontrolu degradace proteinů a jejich přenos přes membrány organel. HSPs mohou interagovat s komponentami signálních drah vedoucích k apoptóze, zabraňují tak smrti buněk a umožňují jejich přežití a proliferaci. Inhibice apoptózy probíhá na třech úrovních: 1. modulací signálních drah spouštějících apoptózu, 2. kontrolou uvolňování apoptotických molekul a 3. blokováním pozdních fází apoptózy. Zvýšená hladina HSP byla identifikována u mnoha lidských malignit a je spojována s jejich odolností vůči apoptóze indukované chemoterapeutiky [35].

2. Kaspázy patří k hlavním proteinům, které spouštějí a dokončují apoptózu. Jejich poškození nebo změna funkce vede ke snížení apoptózy a následné karcinogenezi.

3. Receptory smrti (DRs, Fas TRAILs) a jejich ligandy patří mezi vnější iniciátory apoptózy. Přes doménu smrti aktivují příslušné signální dráhy vedoucí k apoptóze. U různých typů nádorů byla popsána snížená expze receptorů smrti, poruchy jejich funkce nebo nadměrná expze analogů receptorů smrti (decoy receptorů), jež váží stejné ligandy, ale nespouští signální apoptotické dráhy [36].

Vliv buněčného cyklu na chemorezistenci

Účinek cytostatik je ovlivněn fází buněčného cyklu, ve kterém se zasažená buňka nachází. Léčiva poškozující DNA postihují primárně buňky v S-fázi buněčného cyklu, zatímco vřetenkové jedy působí na buňky v mitóze. Buňky v G0/G1 fázi buněčného cyklu jsou relativně rezistentní ke klasické cytotoxické terapii [37]. Současné studie se zabývají možností, že nádory obsahují frakci „klidových“ buněk, které se aktivně (ale reverzibilně) udržují v tomto stavu, kdy snáze odolávají léčivům.

Chemorezistence zprostředkovaná epigenetickými změnami

Je dlouhodobě známo, že nádorová onemocnění jsou spojena s rozsáhlými epigenetickými změnami, např. exprese nádorových supresorů může být potlačena metylacemi jejich promotorů [38]. Tyto změny jsou reverzibilní a mohou být odstraněny použitím látek demethylujících DNA či inhibitorů histonacetylázy (HDAC) [39]. Příkladem jsou buňky nemalobuněčného karcinomu plic (non small cell lung cancer – NSCLC), u kterých se po působení inhibitorů tyrosinkinázy vytvořila malá frakce buněk odolná vůči těmto látkám (drug tolerant persisters – DTPs). Tyto buňky, tvořící 0,3–5 % celkové populace buněk, nebyly stabilně rezistentní. Pokud se DTPs kultivovaly bez přítomnosti inhibitorů, opět začaly být k těmto látkám citlivé. Podrobná analýza zjistila velkou variabilitu v genové expresi, včetně zvýšení exprese genů ovlivňujících chromatinové modifikace jako histon H3K demethyláza (KDM5A) nebo HDAC. Potlačení funkce KDM5A nebo působení inhibitorů HDAC redukovalo počet DTPs, což naznačuje, že za odolnost těchto buněk jsou zodpovědné modifikace chromatinu [40].

Nicméně aktivace umlčených genů je dvousečná zbraň, neboť může dojít zároveň k aktivaci nežádoucích genů odpovědných za rezistenci či za nádorovou transformaci [41].

Rezistentní subpopulace buněk

U nádorových onemocnění s vysokým proliferčním indexem, jako jsou leukemie či lymfomy, byly zaznamenány sub-

populace buněk odolávající vybraným lékům. Například při léčbě chronické myeloidní leukemie (chronic myelogenous leukemia – CML) imatinibem (inhibitor tyrosinkinázy) byla identifikována malá populace leukemických buněk se substitucí aminokyseliny v genu pro ABL kinázu, která chránila buňky před inhibičním účinkem imatinibu [42]. Podobné mutace byly zaznamenány i při použití dalších inhibitorů kináz [43]. Některé nádorové buňky jsou navíc schopny blokovat v jedné signální dráze obejít aktivaci alternativní signální dráhy a eliminovat tak efekt léčiva. Na podobném principu fungují rezistence k látkám inhibujícím HER2 nebo B-RAF. Tento jev je možné překonat podáváním inhibitorů kináz druhé či třetí generace [44]. Ačkoliv tento postup zaznamenává částečný úspěch, je tu několik komplikací. Jedna z nich, zvláště u leukemií a lymfomů, je zablokování programované buněčné smrti [45] a také přítomnost malé frakce nádorových „kmenových“ buněk, které se vyskytují v klidovém stadiu a jsou rezistentní k léčivům. Pokud jsou tyto buňky donuceny k proliferaci, např. pomocí interferonu- α , G-CSF nebo oxidem arzenitým, stávají se citlivými k cytotoxickým látkám [46,47]. Nicméně i terapie založená na tomto přístupu vykazovala nevyrovnané výsledky a nedokázala zabránit návratu onemocnění [48].

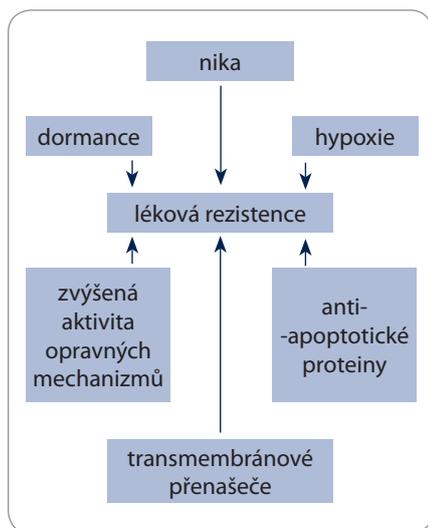
Nádorové kmenové buňky – nádor iniciující buňky (CSCs)

Teorie nádorových kmenových buněk byla formulována v roce 1997 pro akutní myeloidní leukemii (AML) [49] a v roce 2003 byla rozšířena na pevné nádory, přesněji na karcinom mléčné žlázy [50]. Nyní již byly CSCs identifikovány v širokém spektru pevných nádorů jako karcinom plic [51], tlustého střeva [52], prostaty [53], vaječníků [54], mozku [55] či u melanomů [56]. Nicméně se stále jedná o teorii kontroverzní, vyvolávající vášnivé diskuze [57,58].

Předpokládá se, že podobně jako u normálních rostoucích tkání (kostní dřeň, kůže či střevní epitel) je i růst a vývoj nádoru „poháněn“ malým množstvím kmenových buněk, charakterizovaných jako „nesmrtelné“ pluripotentní buňky schopné sebeobnovy [59]. Tyto buňky

odpovídají za iniciaci, vývoj, metastazování a recidivu nádoru a jako jediné jsou schopny vyvolat tvorbu nového nádoru po přenesení do zvířecího modelu. CSCs tvoří 0,1–30 % nádoru podle jeho typu a stadia onemocnění [60]. Velká část nádoru je naopak tvořena rychle rostoucími, případně post-mitotickými diferencovanými buňkami, které však nejsou schopny sebeobnovy a jejichž přínos je z hlediska dlouhodobého udržení nádoru nepatrný [58]. Byly formulovány dva odlišné modely vysvětlující růst nádorů a jejich heterogenitu. Model nádorových kmenových buněk předpokládá, že všechny fáze nádoru, jako iniciace, progres, metastazování apod., jsou závislé především na kmenových buňkách. Heterogenita a hierarchie mezi všemi buňkami nádoru je výsledkem asymetrického dělení CSCs. Tento model vidí nádor jako přísně hierarchickou strukturu s unikátní skupinou buněk schopných sebeobnovy na jejím vrcholu. Všechny ostatní buňky tvořící tělo nádoru jsou odvozené od CSCs a vznikají jejich diferenciací [61]. Druhý, evoluční model, předpokládá, že všechny nádorové buňky přispívají k udržení nádoru, i když s různou intenzitou. Mezibuněčné rozdíly jsou dány především subklonálními rozdíly, způsobenými genetickými nebo epigenetickými změnami během vývoje nádoru [62]. Ačkoliv si oba modely vzájemně odporují, nelze podle posledních poznatků ani jeden z nich vyloučit. Naopak se zdá, že se oba modely prolínají a výsledkem je druhá, agresivnější populace CSCs [63].

I když teorie nádorových kmenových buněk má své trhliny, často se používá pro vysvětlení reziduálního onemocnění. Důvodů pro toto tvrzení je několik (obr. 1). Kmenové buňky včetně CSCs produkují velké množství ABC transmembránových přenašečů, jako P-gp a BCPR [64,65]. Populace buněk s vysokým obsahem ABC přenašečů má větší maligní potenciál a je agresivnější [66]. Pro CSCs stejně jako pro ostatní somatické kmenové buňky je charakteristické pomalé tempo dělení. Není zcela zřejmé, zda tato vlastnost je příčina nižší citlivosti CSCs k chemoterapii, ale obecně se předpokládá, že přispívá k odolnosti vůči cytotoxickým látkám [67,68].



Obr. 1. Hlavní mechanismy lékové rezistence nádorových kmenových buněk.

CSCs také vykazují větší odolnost k poškození DNA, např. ionizujícím zářením [69,70] a často podléhají EMT. Spojení mezi EMT a CSCs pak často souvisí s metastazováním. Pro CSCs je charakteristická aktivace některých antiapoptotických signálních drah. Nejvýznamnější jsou:

1. PI3K/PEN/AKT/mTOR – aktivace AKT je nezbytná pro buněčnou transformaci a vznik nádoru, byla pozorována např. u buněčné transformace zprostředkované v-Abl u leukemií [71]. Podobně i PTEN a mTOR hrají úlohu při udržení leukemických kmenových buněk. Mutace nebo umlčení exprese *PTEN* byly pozorovány u různých typů onkologických onemocnění, jako ALL (akutní lymfoblastická leukemie), karcinom prostaty, melanom, glioblastom a karcinom dělohy [72].

2. JAK/STAT signální dráha je zapojena od iniciace nádoru. Chyby v této dráze byly identifikovány zejména u různých typů leukemií. JAK/STAT signální dráha je negativně regulována rodinou SOCS proteinů. Inhibice těchto proteinů např. fosforylací Bcr-Abl u CML vede k následné buněčné transformaci [73].

3. NF- κ B – tento transkripční faktor reguluje expresi mnoha genů podílejících se na buněčných odpovědích na různé podněty, jako je působení cytokinů, mikrobů, volných radikálů či ultrafialového záření [74], a také ovlivňuje expresi některých antiapoptotických genů (*bcl-2*, *bcl-xL*, *survivin* apod.). Poškození sig-

nální dráhy NF- κ B vede k vývoji nádoru a jeho progresi, chemorezistenci, k chronickým zánětům či autoimunitnímu onemocnění [75,76].

4. Wnt/ β -catenin, Hedgehog a Notch signální dráhy hrají zásadní roli v uchování populace CSCs. Dráha Notch ovlivňuje proces sebeobnovy buněk a je nezbytná pro zachování specifické buněčné linie při diferenciaci normálních buněk mléčné žlázy [77]. U pankreatických nádorových buněk rezistentních ke gemcitabinu bylo prokázáno spojení signální dráhy Notch s metastazováním a EMT [78]. Potlačení signalizace Notch pomocí siRNA vedlo částečně ke zvrácení EMT a k zabránění vzniku rezistence ke gemcitabinu [79]. Poruchy regulace signální dráhy receptoru Hedgehog (Hh) jsou kritickým faktorem při léčbě onemocnění a léky zaměřené na tuto dráhu vykazují slibné výsledky v klinických studiích [80]. Aktivní dráha Hh byla identifikována u leukemií, zejména u primárních leukemických buněk s fenotypem CD34+. Monoklonální protilátka anti-Hh indukuje apoptózu u buněk akutní myeloidní leukemie rezistentních k cytarabinu [81]. Dráha Wnt/ β -catenin hraje významnou úlohu v embryogenezi a podílí se na zachování a proliferaci normálních kmenových buněk. Aktivovaná dráha Wnt/ β -catenin byla identifikována u mnoha typů nádorových onemocnění, jako je leukemie, karcinom tlustého střeva, karcinom mléčné žlázy či kůže, kde navozuje lékovou rezistenci [82,83]. U karcinomu tlustého střeva studie prokázaly mutace genu *APC* (*adenomatous polyposis coli*), které vedou ke stabilizaci β -catenin, následné aktivaci kaskády signální dráhy Wnt a indukci epiteliální transformace buněk [84]. Snížení aktivity dráhy Wnt pomocí siRNA proti β -catenin vedlo k efektivní inhibici proliferace a lékové rezistence u buněk nádorů plic [85]. Podobně zablokování Wnt dráhy u buněk karcinomu tlustého střeva s expresí CD133+ snížilo jejich odolnost k 5-fluorouracilu [79].

Antiapoptotické signální dráhy jsou zapojeny do lékové rezistence zprostředkované CSCs. Specifické inhibitory těchto drah, např. siRNA, miRNA apod., v kombinaci s dalšími léky mohou představovat strategii pro pře-

konání lékové rezistence nádorů a pro eliminaci CSCs.

Terapie zaměřené na nádorové kmenové buňky

Dostupné metody radioterapie či chemoterapie ničí především „tělo“ nádoru a často nezasahují CSCs chráněné různými obrannými mechanismy. U některých typů nádorových onemocnění (glioblastomy, karcinom mléčné žlázy, karcinom tlustého střeva) bylo prokázáno, že reziduální nádory po terapii jsou obohaceny o buňky podobné CSCs [58]. CSCs mohou být snadno detekovány pomocí povrchových receptorů např. kombinací CD34+/CD38– u leukemických buněk nebo CD44+/CD24– případně CD133+ u pevných nádorů [86].

Pokud jsou základem nádoru opravdu kmenové buňky, je pravděpodobné, že reziduální onemocnění se vyvíjí právě z těchto rezistentních CSCs (obr. 2). Tyto druhotné tumory jsou více maligní, rychle metastazují a jsou odolné vůči lékům použitým v první linii léčby. Cílená terapie zasahující CSCs je klíčová pro úspěšnou léčbu maligních onemocnění a mohla by pomoci předcházet recidivě onemocnění [87].

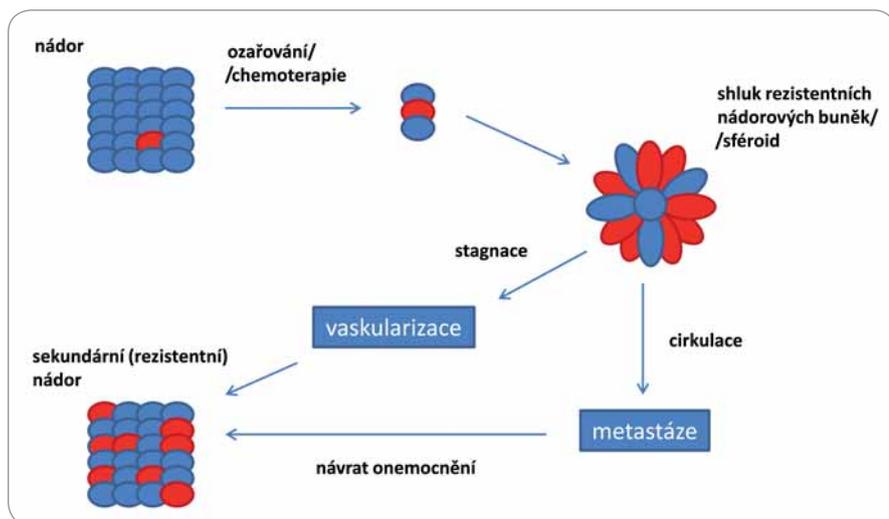
V současné době bylo vyvinuto několik různých terapeutických systémů zaměřených na zničení CSCs, které vykazují slibné výsledky. Můžeme je rozdělit do skupin podle jejich zaměření na:

1. Povrchové markery CSCs

Většinou se jedná o protilátky proti povrchovým markerům nádorových buněk nebo jejich ligandy, (CD44, CD133 apod.), zejména pak o monoklonální protilátky rozeznávající CSCs. Příkladem je gemtuzumab ozogamicin, humanizovaná myši monoklonální protilátka anti-CD33 konjugovaná s cytotoxickou látkou (kalicheamicinem) používaná při léčbě AML (akutní myeloidní leukemie) [88].

2. Transmembránové pumpy řízené ATP

Sledování hladiny exprese ABC přenašečů pomáhá predikovat úspěšnost chemoterapie a snižovat tak náklady na neúčinnou léčbu. Většina léčebných metod zaměřených na ABC přenašeče



Obr. 2. Vznik a vývoj reziduálního onemocnění založený na teorii nádorových kmenových buněk.

Rezistentní CSCs, které přežily předchozí chemoterapii či ozařování, mohou být příčinou vzniku sekundárních invazivních nádorů. CSCs vytvářejí rezistentní mnohobuněčné kulovité útvary tzv. sféroidy. Buňky sféroidů mohou diferencovat do adherentní epiteliální linie, která si zachovává fenotyp původního nádoru, nebo mohou být zodpovědné za metastazování nádoru. Při vývoji metastáz podstatná část CSCs podléhá EMT a formuje sféroidy, které opouští nádor, vstupují do krevního nebo lymfatického systému a ve vhodném prostředí/nice vytvářejí metastázy nebo nové nádory. Nádorové sféroidy mohou diferencovat do různých typů buněk, včetně masivně rostoucích, které agresivně formují nové krevní cévy a krok po kroku dávají vznik nádorové tkáni.

se je snaží obejít, neutralizovat nebo jinak využít a předejít tak vzniku rezistence k lékům. Léčba s využitím inhibitorů P-gp či MRP-1 nebyla příliš úspěšná, proto bylo vyvinuto několik inhibitorů či modulátorů P-gp, které se testují v kombinaci s dalšími protinádorovými léky [89,90]. Alternativní strategie se zaměřuje na regulaci exprese ABC přenašečů např. inhibicí signalizace prostřednictvím receptorů Hedgehog nebo SMO (smoothened) signální dráhy [91].

3. Ovlivnění signálních drah

Aktivní antiapoptotické dráhy a současně inaktivované proapoptotické dráhy jsou dalším oblíbeným cílem nových léčebných strategií. Byly vyvinuty monoklonální protilátky zasahující signální dráhy Notch či Wnt [92,93]. Malé molekuly působící jako antagonisté Hh či inhibitor SMO cyklopamin, inhibující kaskádu Hh, snižují růst, invazivitu a metastazování karcinomů mléčné žlázy, prostaty, slinivky či mozku *in vitro* i *in vivo* [94,95]. Inhibice NF-κB zvyšuje citlivost nádorových buněk k lékům. Kombinace doxorubicinu či paclitaxelu s inhibitory NF-κB

úspěšně překonává mnohočetnou lékovou rezistenci [96,97]. Slibné výsledky v klinických testech byly získány použitím nízkomolekulárního inhibitoru ABT-137 (inhibitor proteinů Bcl-2 rodiny), který zvyšoval citlivost nádorových buněk k ozařování a chemoterapii u mnohočetného myelomu, lymfomu a malobuněčného karcinomu plic [98]. Podobně jsou testovány i inhibitory HSP, zejména inhibitory HSP90 jako geldamycin a jeho deriváty.

4. Mikroprostředí nádorů

Změnou mikroprostředí nádorů a poškozením jejich ochranné bariéry může dojít k potlačení či překonání lékové rezistence. Příkladem je redukce krevního řečiště u myšího glioblastomu pomocí bevacizumabu (inhibitor angiogeneze), kdy dochází k narušení mikroprostředí nádoru a ke snížení počtu nádorových kmenových buněk [99]. Podobně působí i kombinace protilátky anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) a cyklofosfamidů [100].

Dalším příkladem je vazba SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), produkova-

ným stromálními buňkami, na receptor CXCR4 (chemokine receptor type 4) na povrchu leukemických buněk. Touto vazbou se leukemické buňky dostávají do těsného kontaktu se stromálními buňkami kostní dřeně, současně se aktivuje jejich růst a zvyšuje se jejich odolnost k léčbě. Při aplikaci CXCR4 antagonistů, jako je Plerixafor, dochází k rozpadu vazby CDF-1/CXCR4, leukemické buňky se přesouvají mimo kostní dřeň a stávají se citlivější k cytotoxickým lékům [9].

K cílenému transportu léčiv lze také využít mírně kyselé pH prostředí obklopující pevné nádory. Látky citlivé na určité pH konjugované s transportními molekulami a léčivem mohou rychle a přesně dopravit lék na místo s daným pH a podstatně zvýšit jeho účinek [101].

Závěr

Stále se objevují nové důkazy o existenci CSCs u různých typů malignit a o jejich schopnosti sebeobnovy a diferenciaci, jež jsou nezbytné pro vznik, růst, udržení a metastazování nádorů. Metody identifikace a izolace CSCs pomocí nově objevených markerů se neustále zlepšují a pozornost je nyní věnována vývoji terapií zaměřených na CSCs. Lze předpokládat, že komplexní strategie léčby bude dosahovat lepších výsledků. Příkladem je vývoj nanočástic konjugovaných se čtyřmi typy látek: 1. ligandy rozpoznávající specificky CSCs, 2. cytotoxické protinádorové látky zasahující CSCs, 3. látky překonávající lékovou rezistenci a 4. látky usnadňující diagnostiku nádoru. Kombinace těchto složek by měla dosáhnout specifického protinádorového efektu s minimem vedlejších účinků. Navíc tento přístup umožní lokalizaci primárního nádoru i jeho metastáz.

Rozšiřující se poznatky o nádorových kmenových buňkách ukazují další směr v boji s malignitami. Nicméně nalezení strategie využívající unikátních vlastností CSCs vyžaduje další výzkum a spolupráci napříč vědními obory.

Literatura

1. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmaco-

- kinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11(4): 265–283.
2. Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* 2000; 65(1): 95–106.
 3. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE et al. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012; 21(3): 418–429. doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.007.
 4. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012; 21(3): 309–322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
 5. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(5): 392–401.
 6. Feig C, Gopinathan A, Nesses A et al. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012; 18(16): 4266–4276. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3114.
 7. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007; 11(1): 69–82.
 8. Kees T, Egeblad M. Innate immune cells in breast cancer—from villains to heroes? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011; 16(3): 189–203. doi: 10.1007/s10911-011-9224-2.
 9. Konopleva M, Tabe Y, Zeng Z et al. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug Resist Updat* 2009; 12(4–5): 103–113. doi: 10.1016/j.drug.2009.06.001.
 10. Sternlicht MD, Lochter A, Sympon CJ et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999; 98(2): 137–146.
 11. Sutherland RM, Eddy HA, Bareham B et al. Resistance to adriamycin in multicellular spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; 5(8): 1225–1230.
 12. Trédan O, Galmarini CM, Patel K et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(19): 1441–1454.
 13. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 1999; 5(6): 662–668.
 14. Mori Y, Shimizu N, Dallas M et al. Anti- α 4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* 2004; 104(7): 2149–2154.
 15. Park CC, Zhang H, Pallavicini M et al. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res* 2006; 66(3): 1526–1535.
 16. Shain KH, Landowski TH, Dalton WS. Adhesion-mediated intracellular redistribution of c-Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-like inhibitory protein-long confers resistance to CD95-induced apoptosis in hematopoietic cancer cell lines. *J Immunol* 2002; 168(5): 2544–2553.
 17. Hazlehurst LA, Enkemann SA, Beam CA et al. Genotypic and phenotypic comparisons of de novo and acquired melphalan resistance in an isogenic multiple myeloma cell line model. *Cancer Res* 2003; 63(22): 7900–7906.
 18. Sandal T, Valyi-Nagy K, Spencer VA et al. Epigenetic reversion of breast carcinoma phenotype is accompanied by changes in DNA sequestration as measured by AluI restriction enzyme. *Am J Pathol* 2007; 170(5): 1739–1749.
 19. Jones CB, McIntosh J, Huang H et al. Regulation of bleomycin-induced DNA breakage and chromatin structure in lung endothelial cells by integrins and poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Pharmacol* 2001; 59(1): 69–75.
 20. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995; 154(1): 8–20.
 21. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1776–1784.
 22. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172(7): 973–981.
 23. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 442–454.
 24. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010; 29(34): 4741–4751. doi: 10.1038/onc.2010.215.
 25. Chiba N, Comaills V, Shiotani B et al. Homeobox B9 induces epithelial-to-mesenchymal transition-associated radioresistance by accelerating DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(8): 2760–2765. doi: 10.1073/pnas.1018867108.
 26. Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1): 38–47.
 27. Semenza GL. Hypoxia and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(2): 223–224.
 28. Wirthner R, Wrann S, Balamurugan K et al. Impaired DNA double-strand break repair contributes to chemoresistance in HIF-1 alpha-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis* 2008; 29(12): 2306–2316. doi: 10.1093/carcin/bgn231.
 29. Choi YJ, Rho JK, Lee SJ et al. HIF-1 α modulation by topoisomerase inhibitors in non-small cell lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135(8): 1047–1053. doi: 10.1007/s00432-009-0543-2.
 30. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455(1): 152–162.
 31. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA et al. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(3): 219–234.
 32. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG et al. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 2004; 5(1): 21–53.
 33. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)* 2011; 3(4): 279–296. doi: 10.1039/c0ib00144a.
 34. Wei Y, Fan T, Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008; 40(4): 278–288.
 35. Lanneau D, Brunet M, Frisan E et al. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 2008; 12(3): 743–761. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x.
 36. Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol* 2010; 2010: 370835. doi: 10.1155/2010/370835.
 37. Stewart DJ, Chiritescu G, Dahrrouge S et al. Chemotherapy dose – response relationships in non-small cell lung cancer and implied resistance mechanisms. *Cancer Treat Rev* 2007; 33(2): 101–137.
 38. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(11): 1148–1159. doi: 10.1056/NEJMra072067.
 39. Tsai HC, Li H, Van Neste L et al. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* 2012; 21(3): 430–446. doi: 10.1016/j.ccr.2011.12.029.
 40. Sharma SV, Lee DY, Li B et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 2010; 141(1): 69–80. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.027.
 41. Hauswald S, Duque-Afonso J, Wagner MM et al. Histone deacetylase inhibitors induce a very broad, pleiotropic anticancer drug resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by modulation of multiple ABC transporter genes. *Clin Cancer Res* 2009; 15(11): 3705–3715. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2048.
 42. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293(5531): 876–880.
 43. Carter TA, Wodicka LM, Shah NP et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(31): 11011–11016.
 44. Kaiser J. Combining targeted drugs to stop resistant tumors. *Science* 2011; 331(6024): 1542–1545. doi: 10.1126/science.331.6024.1542.
 45. Duy C, Hurtz C, Shojaaee S et al. BCL6 enables Ph+ acute lymphoblastic leukaemia cells to survive BCR-ABL1 kinase inhibition. *Nature* 2011; 473(7347): 384–388. doi: 10.1038/nature09883.
 46. Essers MA, Trumpp A. Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Mol Oncol* 2010; 4(5): 443–450. doi: 10.1016/j.molonc.2010.06.001.
 47. Saito Y, Uchida N, Tanaka S et al. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nat Biotechnol* 2010; 28(3): 275–280. doi: 10.1038/nbt.1607.
 48. Jiang X, Zhao Y, Smith C et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 2007; 21(5): 926–935.
 49. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3(7): 730–737.
 50. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7): 3983–3988.
 51. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121(6): 823–835.
 52. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445(7123): 106–110.
 53. Collins AT, Berry PA, Hyde C et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65(23): 10946–10951.
 54. Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(30): 11154–11159.
 55. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 2006; 444(7120): 761–765.
 56. Fang D, Nguyen TK, Leishear K et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005; 65(20): 9328–9337.
 57. Jordan CT. Cancer stem cells: controversial or just misunderstood? *Cell Stem Cell* 2009; 4(3): 203–205. doi: 10.1016/j.stem.2009.02.003.
 58. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011; 17(3): 313–319. doi: 10.1038/nm.2304.
 59. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 105–111.
 60. Adams JM, Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res* 2008; 68(11): 4018–4021. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6334.
 61. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* 2012; 22(3): 457–472. doi: 10.1038/cr.2012.13.
 62. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 2007; 6(19): 2332–2338.
 63. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805(1): 105–117. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.11.002.
 64. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006; 439(7072): 84–88.
 65. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved

- ved questions. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(10): 755–768. doi: 10.1038/nrc2499.
66. Deeley RG, Westlake C, Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 2006; 86(3): 849–899.
67. Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol* 2010; 46(3): 308–316. doi: 10.1007/s12033-010-9321-2.
68. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(11): 834–846.
69. Bao S, Wu Q, McLendon RE et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444(7120): 756–760.
70. Diehn M, Cho RW, Lobo NA et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 780–783. doi: 10.1038/nature07733.
71. Guo G, Qiu X, Wang S et al. Oncogenic E17K mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 promotes v-Abl-mediated pre-B-cell transformation and survival of Pim-deficient cells. *Oncogene* 2010; 29(26): 3845–3853. doi: 10.1038/ncr.2010.149.
72. Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R et al. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; 114(3): 647–650. doi: 10.1182/blood-2009-02-206722.
73. Qiu X, Guo G, Chen K et al. A requirement for SOCS-1 and SOCS-3 phosphorylation in Bcr-Abl-induced tumorigenesis. *Neoplasia* 2012; 14(6): 547–558.
74. Baud V, Karin M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(1): 33–40. doi: 10.1038/nrd2781.
75. Grivnenkov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell* 2010; 140(6): 883–899. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
76. Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR et al. NF- κ B addiction and its role in cancer: „one size does not fit all“. *Oncogene* 2011; 30(14): 1615–1630. doi: 10.1038/ncr.2010.566.
77. Dontu G, Jackson KW, McNicholas E et al. Role of notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res* 2004; 6(6): R605–R615.
78. Williams RF, Sims TL, Tracey L et al. Maturation of tumor vasculature by interferon-beta disrupts the vascular niche of glioma stem cells. *Anticancer Res* 2010; 30(9): 3301–3308.
79. Deng YH, Pu XX, Huang MJ et al. 5-Fluorouracil upregulates the activity of wnt signaling pathway in CD133-positive colon cancer stem-like cells. *Chin J Cancer* 2010; 29(9): 810–815.
80. Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog – a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010; 16(12): 3130–3140. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2846.
81. Kobune M, Takimoto R, Murase K et al. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. *Cancer Sci* 2009; 100(5): 948–955. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01111.x.
82. Malanchi I, Peinado H, Kassen D et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* 2008; 452(7187): 650–653. doi: 10.1038/nature06835.
83. Zeng YA, Nusse R. Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. *Cell Stem Cell* 2010; 6(6): 568–577. doi: 10.1016/j.stem.2010.03.020.
84. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434(7035): 843–850.
85. Teng Y, Wang X, Wang Y et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 392(3): 373–379. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.028.
86. Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioessays* 2009; 31(10): 1038–1049. doi: 10.1002/bies.200900058.
87. Zhou BB, Zhang H, Damelin M et al. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(10): 806–823. doi: 10.1038/nrd2137.
88. Curriel TJ. Immunotherapy: a useful strategy to help combat multidrug resistance. *Drug Resist Updat* 2012; 15(1–2): 106–113. doi: 10.1016/j.drug.2012.03.003.
89. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981; 41(5): 1967–1972.
90. Khadair A, Chen D, Patil Y et al. Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. *J Control Release* 2010; 141(2): 137–144. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.09.004.
91. Sims-Mourtada J, Izzo JG, Ajani J et al. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. *Oncogene* 2007; 26(38): 5674–5679.
92. Li K, Li Y, Wu W et al. Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3. *J Biol Chem* 2008; 283(12): 8046–8054. doi: 10.1074/jbc.M800170200.
93. He B, Reguart N, You L et al. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene* 2005; 24(18): 3054–3058.
94. Ramaswamy B, Lu Y, Teng KY et al. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. *Cancer Res* 2012; 72(19): 5048–5059. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1248.
95. Feldmann G, Habbe N, Dhara S et al. Hedgehog inhibition prolongs survival in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2008; 57(10): 1420–1430. doi: 10.1136/gut.2007.148189.
96. Fan L, Li F, Zhang H et al. Co-delivery of PDTC and doxorubicin by multifunctional micellar nanoparticles to achieve active targeted drug delivery and overcome multidrug resistance. *Biomaterials* 2010; 31(21): 5634–5642. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.066.
97. Ganta S, Amiji M. Co-administration of Paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. *Mol Pharm* 2009; 6(3): 928–939. doi: 10.1021/mp800240j.
98. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15(4): 1126–1132. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0144.
99. Burkhardt JK, Hofstetter CP, Santillan A et al. Orthotopic glioblastoma stem-like cell xenograft model in mice to evaluate intra-arterial delivery of bevacizumab: from bedside to bench. *J Clin Neurosci* 2012; 19(11): 1568–1572. doi: 10.1016/j.jocn.2012.03.012.
100. Folkins C, Man S, Xu P et al. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res* 2007; 67(8): 3560–3564.
101. Lee ES, Gao Z, Kim D et al. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH(e) specific TAT exposure and multidrug resistance. *J Control Release* 2008; 129(3): 228–236. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.04.024.

Funkční testy pro detekci nádorových kmenových buněk

Functional Assays for Detection of Cancer Stem Cells

Škoda J.^{1,2}, Neradil J.^{1,3}, Veselská R.^{1,2}

¹ Laboratoř nádorové biologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

² Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

³ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Nádorové kmenové buňky (cancer stem cells – CSCs) jsou považovány za populaci buněk, která odpovídá za iniciaci a progresi nádoru, účastní se procesu metastazování a je možnou příčinou získané lékové rezistence a rekurence nádorů. CSCs disponují schopností sebeobnovy a mají tumorigenní potenciál. Funkční testy, které umožňují detekovat zmiňované vlastnosti, jsou hlavním nástrojem pro identifikaci nádorových kmenových buněk. Tento článek přináší ucelený přehled *in vivo* a *in vitro* metod využívaných pro průkaz CSCs s důrazem na recentně zaváděné techniky detekce CSCs. Mezi nejčastěji prováděné funkční testy patří test tumorigenicity *in vivo*, testy tvorby sfér (sphere formation assay) a kolonií (colony-forming unit assay) a rovněž detekce tzv. vedlejší populace (side population). Dále jsou popsány metody zadržování detekční značky (label-retention assay) a test aktivity aldehyddehydrogenázy.

Klíčová slova

nádorové kmenové buňky – funkční testy – tumorigenicita – nádorové sféry – tvorba kolonií – vedlejší populace buněk – aldehyddehydrogenáza

Summary

Cancer stem cells (CSCs) are considered to be a population of tumor cells, which are responsible for tumor initiation and progression. They are also involved in metastasizing and may be a possible cause of multidrug resistance and tumor recurrence. CSCs possess the ability to self-renew and show a tumorigenic potential. Functional assays, which enable the detection of these properties, represent the main tool for identification of CSCs. This article summarizes both *in vitro* and *in vivo* methods used to identify the CSCs with emphasis on recently employed techniques of CSCs detection. *In vivo* tumorigenicity assay, sphere formation assay and colony-forming unit assay belong to the most commonly used functional assays. Further, label-retention assay and aldehyde dehydrogenase activity assay are described in this article.

Key words

cancer stem cells – functional assays – tumorigenicity – tumor spheres – colony-forming unit assay – side population cells – aldehyde dehydrogenase

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT13443-4 a Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101 a projektem CEB, OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0183.

The study was supported by grant of Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health No. NT13443-4 and by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101 and by the project CEB, OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0183.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Jan Škoda

Laboratoř nádorové biologie
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
e-mail: janskoda@sci.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 16. 1. 2014

Přijato/Accepted: 4. 4. 2014

Úvod

Nádorové kmenové buňky (cancer stem cells – CSCs) jsou definovány jako subpopulace buněk nádoru, které jsou schopny sebeobnovy a mají potenciál diferencovat do všech typů nádorových buněk tvořících masu daného nádoru [1]. Dle tohoto modelu odpovídají CSCs za iniciaci a kontinuální růst nádoru a jsou také příčinou vysoké buněčné heterogenity, se kterou se u mnoha typů nádorů setkáváme [2]. Navíc již v řadě studií bylo prokázáno, že CSCs (podobně jako jiné druhy kmenových buněk) disponují zvýšenou odolností proti chemoterapii a radioterapii [3–5]. Z toho lze usuzovat, že právě CSCs by mohly být příčinou často se vyskytující získané lékové rezistence a rekurence nádorů, které představují v současnosti největší problém v léčbě nádorových onemocnění. Zatímco dosavadní léčba nádorů se zaměřuje především na redukci celkové hmoty nádoru, limitem v dlouhodo-

bém vyléčení nemoci mohou být právě rezistentní CSCs, jež v určitém čase po terapii dají vzniknout nové populaci nádorových buněk – často již rezistentních k původní léčbě. Zejména v posledním desetiletí proto CSCs představují významnou oblast výzkumu nádorových onemocnění a recentní studie přinášejí slibné výsledky, kdy kombinovaná léčba zaměřující se mj. na CSCs vede k lepší léčebné odpovědi [3].

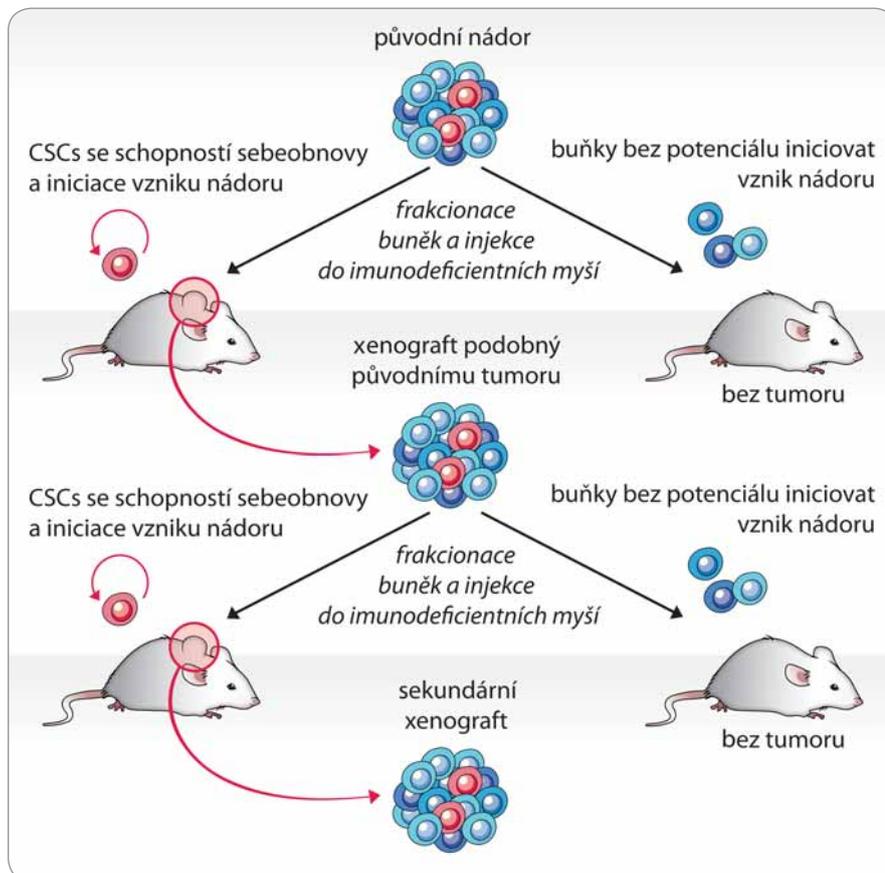
Základ modelu CSCs lze dohledat již v roce 1855, kdy Rudolf Virchow představil teorii, podle které nádory vznikají z nezralých buněk [6]. Termín „nádorové kmenové buňky“ byl však použit až v roce 1959 pro popis nepočtené populace buněk, jež byly rezistentní k chemoterapii a nacházely se u nich odlišné chromozomální změny v porovnání s ostatními buňkami nádoru [7]. Následné transplantační experimenty *in vivo* a klonogenní testy *in vitro* provedené v 70. letech minulého století potvr-

dily, že nádory mohou vznikat ze vzácně se vyskytujících buněk, které mají schopnost sebeobnovy a jsou schopny rekapitulovat buněčnou heterogenitu původního nádoru. S rozvojem technik průtokové cytometrie a s přispěním poznatků o biologii kmenových buněk bylo možné izolovat CSCs z nádorové tkáně na základě specifických povrchových markerů, často shodných s těmi, které se využívají pro identifikaci adultních kmenových buněk. Tímto přístupem byly CSCs nejprve identifikovány u hematologických malignit [8], později u karcinomu prsu [9] a poté u celé řady dalších solidních nádorů [10]. V současné době je sortování buněk na základě povrchových markerů obecně uplatňovaným přístupem při výzkumu CSCs. Specifita markerů CSCs se však může mezi jednotlivými typy nádorů lišit a je nezbytné ověřit, zda izolovaná populace buněk disponuje základními vlastnostmi CSCs – schopností sebeobnovy a tumorigeneze. Pro tyto účely se využívají funkční testy, které lze dle metodického přístupu rozdělit na testy *in vivo* a *in vitro*. V následujících kapitolách bude podán přehled těchto metod.

Funkční testy CSCs *in vivo*

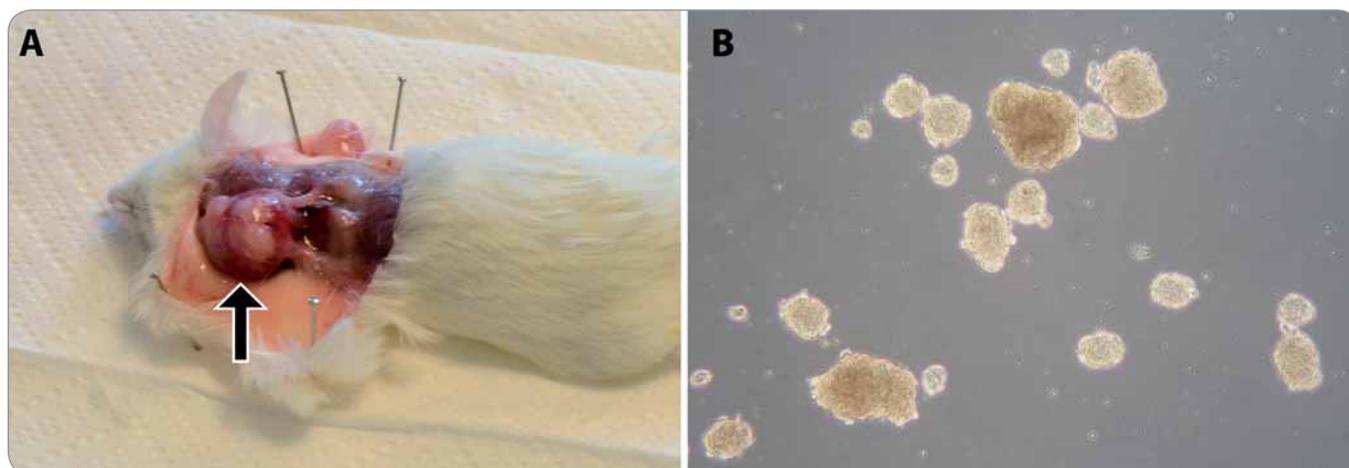
Test tumorigenicity

Test tumorigenicity představuje dosud nejlepší funkční test fenotypu CSCs, kterým lze současně ověřit schopnost sebeobnovy i schopnost vytvořit nádor, jenž rekapituluje buněčnou heterogenitu nádoru původního, a to přímo v prostředí *in vivo*. Principem testu je opakovaná transplantace testovaných buněk do zvířecího modelu, nejčastěji myši imunodeficientního kmene – typicky NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency) (obr. 1) [1]. Dle původu a homogenity testované populace buněk bývá do vhodného místa myši injikována 100 až několik milionů buněk [9,11,12]. Injicace se obvykle provádí subkutánně, ale buňky lze transplantovat i do jednotlivých orgánů – mozku [11,13], svalů [12] či prsní žlázy [14]. Myši jsou poté průběžně kontrolovány a v případě nálezu nádoru nebo po uplynutí stanovené doby jsou usmrceny (obr. 2A). Schopnost tumorigeneze je hodnocena na základě



Obr. 1. Schéma testu tumorigenicity.

Průkaz fenotypu CSCs je proveden opakovanou transplantací izolovaných buněčných populací, které jsou schopny po injikaci do imunodeficientní myši vytvořit nádor.



Obr. 2. Ukázky našich výsledků funkčních testů CSCs u rabdomyosarkomu a osteosarkomu.

A. Xenografťový nádor v podkoží myši kmene NOD/SCID/IL2Ry_{null} po injikaci rabdomyosarkomových buněk. Šipka označuje lokalizaci nádoru. B. Sarkosféry vytvořené z osteosarkomové linie OSA-02.

poměru počtu zvířat, u kterých se vyvíjel nádor, k počtu celkově injikovaných. Mezi další kritéria hodnocení pak patří velikost nádoru, doba do nálezu tumoru a počet injikovaných buněk. Schopnost sebeobnovy je však potřeba dále ověřit opakovanou izolací CSCs z xenografťového nádoru a jejich transplantací do dalšího zvířete (obr. 1) [1].

Ve většině prvotních prací prokazujících přítomnost nepočtené populace CSCs u různých typů nádorů byly pro test tumorigenicity využívány NOD/SCID myši. V posledních letech ale byly publikovány práce, které ukázaly, že tumorigenicita testovaných buněk (a tedy i senzitivita testu) může být výrazně zvýšena použitím více imunodeficientních transgenních myších kmenů NOD/SCID/IL2Ry_{null}, NOD/ShiLtSz-scid/IL2Ry_{null} (NSG) a NOD/ShiJic-scid/IL2Ry_{null} (NOG), nesoucích mutaci v genu pro řetězec gama receptoru pro interleukin-2 [15]. Použitím NSG myši se u maligního melanomu zvýšilo vypočítané zastoupení CSCs z původně publikovaných 0,0001 % na 25 %, přičemž nádory u myši vznikaly již při injikaci jediné buňky [16]. Podobně došlo ke zvýšení tumorigenicity u leukemických kmenových buněk [17]. Ačkoliv u některých solidních nádorů, např. adenokarcinomu pankreatu, nebyla pozorována změna ve frekvenci výskytu CSCs [18], využití NSG myši obecně zkrátilo dobu do prvního nálezu nádoru. Právě časová náročnost testu tumorige-

nicity, kdy od injekce testovaných buněk do vytvoření nádoru uplyne často i několik měsíců, je jedna z nevýhod tohoto testu. CSCs mohou během této doby projít řadou genetických a epigenetických změn, což znesnadňuje interpretaci výsledků testu [1]. Využití více imunodeficientních kmenů myši, NSG a NOG, se proto jeví jako vhodná optimalizace testu.

Další limit testu tumorigenicity může představovat mikroprostředí v místě transplantace a způsob injikace buněk. Je známo, že kmenové buňky jsou do značné míry závislé na produkci signálů od okolního stromatu [19]. Při experimentech, kdy byly do myši injikovány smíšené populace nádorových buněk a fibroblastů asociovaných s nádorem (cancer-associated fibroblasts), došlo ke zvýšení agresivity a velikosti nádoru [20]. Kombinace nádorových buněk s normálními diploidními fibroblasty měla po transplantaci do myši efekt opačný. Výsledky některých studií ukazují, že i samotné nádorové stroma ovlivňuje okolní buňky a původně nenádorové buňky umístěné do jeho blízkosti se pravděpodobně v důsledku genetických či epigenetických změn stávají tumorigenními [21–24]. Míra tumorigenicity může být také zvýšena přidáním mitoticky inaktivovaných podpůrných buněk (feeder cells) nebo Matrigelu™, který obsahuje proteiny extracelulární matrix [1,16,25,26].

Potřeba sledovat interakce CSCs a mikroprostředí *in vivo* vedla v posledních letech k rozvoji specializovaných metod založených na intravitální mikroskopii a multifotonovém zobrazování [27]. Pomocí těchto metod je možné v čase a při rozlišení jednotlivých buněk pozorovat buňky exprimující fluorescenční protein přímo v myši bez nutnosti jejího usmrcení či narušení příslušné tkáně. To mimo jiné umožňuje sledování původu buněk (lineage tracing), což pomáhá lépe pochopit dynamiku tumorigeneze. V recentních studiích byly fluorescenčně značené nádorové buňky získány dvěma způsoby: 1. využitím transgenních kmenů myši, které spontánně vytvářejí nádory a zároveň v buňkách obsahují fluorescenční protein s regulovatelnou expresí [28–30], nebo 2. pomocí transdukce izolovaných buněk příslušnou fluorescenční značkou a jejich xenotransplantací do imunodeficientní myši [31]. Právě tento druhý přístup, kdy je možné izolovanou populaci CSCs značit fluorescenčním proteinem, injikovat do myši (případně i společně s dalšími odlišně značenými populacemi buněk) a sledovat v čase, by se v budoucnu mohl stát optimálním rozšířením klasického testu CSCs *in vivo*.

Funkční testy CSCs *in vitro*

Oproti metodám *in vivo* jsou *in vitro* testy fenotypu CSCs výhodné zejména z důvodu menší časové a finanční ná-

ročnosti. I přesto je nutné výsledky získané *in vitro* ověřit testem *in vivo*. Dobře navržený funkční test *in vitro* by měl mít dostatečnou specifitu a citlivost pro detekci nízce zastoupené populace CSCs a zároveň by měl umožňovat kvantitativní hodnocení. Mezi nejčastěji využívané funkční testy *in vitro* patří: 1. test tvorby buněčných sfér (sphere formation assay), 2. test tvorby kolonií (colony-forming unit – CFU assay), označovaný též jako klonogenní test, 3. detekce vedlejší populace (side population – SP analysis), 4. test zadržování detekční značky v buňce (label-retention assay) a 5. test aktivity aldehyddehydrogenázy [1,32].

Test tvorby buněčných sfér

Průkaz schopnosti původně jednotlivých buněk dělit se a vytvářet sféry – tedy kulovité shluky buněk – umožňuje kvantifikovat aktivitu a sebeobnovu CSCs (obr. 2B) [33]. Test je prováděn v médiu s definovaným obsahem růstových faktorů, aby se minimalizovalo působení externích buněčných signálů, a za neadherentních podmínek kvůli ověření nezávislosti na adhezenci k substrátu. Pro ověření sebeobnovy CSCs je nutné sféry opakovaně pasážovat – sféry jsou enzymaticky převedeny na suspenzi jednotlivých buněk a opětovně kultivovány za definovaných podmínek [34,35]. Dle počtu zformovaných sfér v druhé a dalších generacích lze určit nejen schopnost sebeobnovy, ale také klonogenitu příslušných buněk.

Buněčné sféry byly odvozeny z celé řady nádorů a často bývají nazývány dle tkáňového původu nebo názvu nádoru (uvedeno v závorce): neuronální nádory (neurosféry) [13,36], karcinom prsu (mamosféry) [14], rabdomyosarkom (rabdosféry) [12], osteosarkom (sarkosféry) [37,38], karcinom tlustého střeva (kolonosféry) [39], karcinom prostaty (prostasféry) [40] a hepatom (hepatosféry) [41].

Nevýhodou počátečních experimentů prováděných v tekutém médiu byla skutečnost, že mohlo docházet k agregaci buněk, a sféry tak mohly vznikat z více než jedné buňky, přičemž tento aspekt je ale zásadním kritériem pro hodnocení testu. Uvedený problém lze překonat použitím semisolidního média, které

omezuje pohyb buněk a tím i jejich možnou agregaci [37,38].

Obdobu testu tvorby sfér představuje test tvorby kolonií z jednobuněčné suspenze v měkkém agaru (soft agar colony-forming assay), v němž je také ověřována schopnost sebeobnovy, tumorigenity a klonogenity CSCs [37,40]. Dělením jednotlivých buněk dochází v agaru ke vzniku trojrozměrných buněčných kolonií.

Test tvorby kolonií

Princip této metody je podobný jako u předchozího testu. Suspenze jednotlivých buněk izolované populace se vyseje na kultivační misku a po určité době se vyhodnotí počet kolonií (obvykle musí být tvořeny více než 30–70 buňkami) [41–44]. Kultivace však probíhá za adherentních podmínek v médiu s přidávkem séra. Povrch kultivačních misek může být případně potažen Matrigelem™ [41].

V minulém roce byl publikován postup, který test tvorby kolonií do značné míry automatizuje [44]. Buňky byly tříděny metodou FACS (fluorescence-activated cell sorting, třídění buněk pomocí fluorescence) na základě exprese povrchových markerů CSCs a jednotlivě automaticky vysety do 96jamkových nebo 384jamkových mikrotitračních destiček. Tento přístup výrazně zkracuje časovou a manuální náročnost testu a díky použití vícejamkových destiček umožňuje velmi rychlé kvantitativní hodnocení, např. fluorescenčním skenovacím cytometrem [45].

Detekce vedlejší populace

Vedlejší populace (side population – SP) je definována jako populace buněk, která je schopna z cytoplazmy vylučovat fluorescenční barvivo Hoechst 33342 [46]. Tento fluorochrom s emisním maximem 460 nm (modrá barva spektra) má schopnost vázat se na DNA a v tomto stavu lze navíc detekovat emisi i v červené části spektra. Toho se využívá při průtokové cytometrii, případně při FACS, kdy SP vykazuje výrazně nižší fluorescenci v červeném spektru oproti modrému spektru.

K vypuzování fluorescenčního barviva dochází aktivitou membráno-

vých proteinů spadajících do rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů, které jsou mimo jiné odpovědné za transport xenobiotik [46,47]. V souvislosti s CSCs je z této skupiny nejčastěji zkoumaný protein ABCG2, jehož zvýšená exprese je považována za možnou příčinu rezistence CSCs k chemoterapeutikům [47,48]. Při detekci nebo izolaci CSCs na základě SP je proto nezbytné provést kontrolní experiment s využitím některého z inhibitorů ABCG2 proteinu – nejčastěji se používají verapamil [49] nebo fumitremorgin C [50].

Určitou nevýhodou detekce SP fluorochromem Hoechst 33342 je nutnost použití excitačního UV laseru (355 nm), který nebývá v základní konfiguraci obvykle používaných průtokových cytometrů. Jako alternativu k barvivo Hoechst 33342 lze použít rhodamin 123 (Rho123), který je vylučován stejným typem membránového transportéru a jeho excitace se provádí pomocí základního modrého laseru (488 nm) [38].

Test zadržování detekční značky

Další *in vitro* metodou pro identifikaci CSCs izolovaných ze solidních nádorů je test schopnosti zadržování detekční značky v buňce (label-retention assay) [51–53]. V literatuře lze najít pod označením „label-retention assay“ dvě metody značení buněk.

Původní metoda vychází z hypotézy existence „nesmrtelného řetězce“ (immortal strand hypothesis) a jejím cílem je průkaz kmenových buněk pomocí značení mateřského řetězce DNA H3-thymidinem nebo bromdeoxyuridinem [51,54]. Testované buňky jsou nejprve označeny některým z těchto prekurzorů a po několika buněčných děleních je u nich detekována intenzita signálu. Během asymetrického dělení by měly kmenové buňky zadržovat značený mateřský („nesmrtelný“) řetězec a do dceřiné buňky by měl být předáván pouze nově vzniklý neznačený řetězec. Jiným vysvětlením pro zadržování detekční značky by mohl být prodloužený buněčný cyklus CSCs oproti ostatním buňkám nádoru. U buněk, které nemají vlastnosti CSCs, by mělo jejich dělením docházet k rozředění značených řetězců v populaci dceřiných buněk [55].

Druhá z metod označovaných jako „label-retention assay“ využívá stabilní značení buněk fluorochromy [52,56]. Při buněčném dělení dochází k rovnoměrnému rozdělení těchto fluorochromů do dceřiných buněk, a tedy ke snížení fluorescence jednotlivých buněk na polovinu. Po určitém počtu dělení (obvykle 8–10) dojde ke snížení intenzity fluorescence na úroveň neznačených buněk. Hodnocením fluorescence jednotlivých buněk lze potom určit míru proliferace dané populace buněk. Pro značení buněk je využíváno fluorescenční barvivo CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidylester), které volně prostupuje přes plazmatickou membránu a kovalentně se váže na proteiny v buňkách, nebo sondy PKH26 a Dil, jež se vážou na plazmatickou membránu. Na základě vysoké fluorescence v důsledku prodlouženého buněčného cyklu byla pomocí této metody detekována populace buněk, která vykazuje další znaky typické pro CSCs, jako je zvýšená schopnost tvorby kolonií, tumorigeneze *in vivo* a exprese markerů kmenových buněk [57].

Test aktivity aldehyddehydrogenázy

Expres aldehyddehydrogenázy (ALDH) je specifická pro kmenové buňky, a je proto využívána jako jeden z jejich markerů [58]. Měření aktivity ALDH pomocí štěpení specifického substrátu patří mezi funkční testy fenotypu CSCs [59]. Substrát označovaný jako BAAA (BODIPY aminoacetaldehyde) proniká difúzí do buňky, kde je štěpen pomocí ALDH na BAA (BODIPY amino acetate) a dochází tak k emisi fluorescence, která může být kvantifikována pomocí průtokové cytometrie. Buňky s vysokou intenzitou fluorescence (a tedy vysokou aktivitou ALDH) jsou považovány za CSCs. V současnosti existuje komerčně dostupný systém pro detekci aktivity ALDH pod označením Aldefluor™.

Závěr

Funkční testy pro detekci buněk s fenotypem CSCs představují nepostradatelnou součást aktuálního výzkumu nádorových onemocnění. Metodické přístupy, které byly pro účely detekce CSCs vyvinuty, jsou postupně využívány i pro výzkum léčiv cílených na CSCs

stejně jako pro vývoj protinádorových léčiv obecně. Nádorové sféry představují lepší model solidního nádoru v podmínkách *in vitro* než buňky pěstované jako monolayer. Automatizovaná příprava kolonií umožňuje vysoce efektivně testovat a kvantifikovat účinky léčiv. Sledování původu buněk u transgenních kmenů myši může v budoucnu ukázat, které populace buněk jsou v organizmu použitou léčbou ovlivněny. Lze očekávat, že při dalším vývoji funkčních testů CSCs bude snaha lépe postihnout i vliv nádorového mikroprostředí na funkci CSCs a testy budou rozšiřovány o metody sledování původu buněk, které pomohou charakterizovat interakce CSCs a ostatních buněk nádoru.

Literatura

- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB et al. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66(19): 9339–9344.
- Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 2012; 21(3): 283–296. doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.003.
- Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Galsky M et al. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene* 2013; 10: 1–13. doi: 10.1038/ncr.2013.411.
- Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(7): 545–554. doi: 10.1038/nrc2419.
- Hittelman WN, Liao Y, Wang L et al. Are cancer stem cells radioresistant? *Future Oncol* 2010; 6(10): 1563–1576. doi: 10.2217/fon.10.121.
- Cogle CR. Cancer stem cells: historical perspectives and lessons from leukemia. In: Alison AL (ed.). *Cancer stem cells in solid tumors*. Springer 2011; 3–11.
- Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR et al. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun Signal* 2010; 8(1): 6. doi: 10.1186/1478-811X-8-6.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3(7): 730–737.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7): 3983–3988.
- Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(10): 727–738. doi: 10.1038/nrc3597.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432(7015): 396–401.
- Walter D, Sathesha S, Albrecht P et al. CD133 positive embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population is enriched in rhabdospheres. *PLoS One* 2011; 6(5): e19506. doi: 10.1371/journal.pone.0019506.
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(25): 15178–15183.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N et al. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005; 65(13): 5506–5511.

- McDermott SP, Eppert K, Lechman ER et al. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood* 2010; 116(2): 193–200. doi: 10.1182/blood-2010-02-271841.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456(7222): 593–598. doi: 10.1038/nature07567.
- Agliano A, Martin-Padura I, Mancuso P et al. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int J Cancer* 2008; 123(9): 2222–2227. doi: 10.1002/ijc.23772.
- Ishizawa K, Rasheed ZA, Karisch R et al. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell* 2010; 7(3): 279–282. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.009.
- Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006; 441: 1075–1079.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121(3): 335–348.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59(19): 5002–5011.
- Tzukerman M, Skorecki K. A novel experimental platform for investigating tumorigenesis and anti-cancer therapy in a human microenvironment derived from embryonic stem cells. *Discov Med* 2003; 3(19): 51–54.
- Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004; 45 (Suppl 2): 163–175.
- Fabris VT, Sahores A, Vanzulli SI et al. Inoculated mammary carcinoma-associated fibroblasts: contribution to hormone independent tumor growth. *BMC Cancer* 2010; 10: 293. doi: 10.1186/1471-2407-10-293.
- Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL et al. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(8): 3722–3727. doi: 10.1073/pnas.0915135107.
- Di Fiore R, Guercio A, Puleio R et al. Modeling human osteosarcoma in mice through 3AB-OS cancer stem cell xenografts. *J Cell Biochem* 2012; 113(11): 3380–3392. doi: 10.1002/jcb.24214.
- Wyckoff J, Gligorijevic B, Entenberg D et al. High-resolution multiphoton imaging of tumors *in vivo*. *Cold Spring Harb Protoc* 2011; 2011(10): 1167–1184. doi: 10.1101/pdb.top065904.
- Chen J, Li Y, Yu TS et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012; 488(7412): 522–526. doi: 10.1038/nature11287.
- Driessens G, Beck B, Caauwe A et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* 2012; 488(7412): 527–530. doi: 10.1038/nature11344.
- Zomer A, Ellenbroek SI, Ritsma L et al. Intravital imaging of cancer stem cell plasticity in mammary tumors. *Stem Cells* 2013; 31(3): 602–606. doi: 10.1002/stem.1296.
- Lathia JD, Gallagher J, Myers JT et al. Direct *in vivo* evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. *PLoS One* 2011; 6(9): e24807. doi: 10.1371/journal.pone.0024807.
- Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for the therapy? *J Pathol* 2011; 223(2): 147–161. doi: 10.1002/path.2793.
- Shaw FL, Harrison H, Spence K et al. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012; 17(2): 111–117. doi: 10.1007/s10911-012-9255-3.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255(5052): 1707–1710.
- Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology

- and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10(1): 75–86.
36. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63(18): 5821–5828.
37. Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R et al. Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One* 2008; 3(10): e3469. doi: 10.1371/journal.pone.0003469.
38. Di Fiore R, Santulli A, Ferrante R et al. Identification and expansion of human osteosarcoma-cancer-stem cells by long-term 3-aminobenzamide treatment. *J Cell Physiol* 2009; 219(2): 301–313. doi: 10.1002/jcp.21667.
39. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J et al. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer* 2010; 9: 212. doi: 10.1186/1476-4598-9-212.
40. Lee EK, Cho H, Kim CW. Proteomic analysis of cancer stem cells in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412(2): 279–285. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.083.
41. Cao L, Zhou Y, Zhai B et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 71. doi: 10.1186/1471-230X-11-71.
42. Ye J, Wu D, Shen J et al. Enrichment of colorectal cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition via CDH1 knockdown. *Mol Med Rep* 2012; 6(3): 507–512. doi: 10.3892/mmr.2012.938.
43. Yang M, Yan M, Zhang R et al. Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells. *Cancer Sci* 2011; 102(10): 1774–1781. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02028.x.
44. Fedr R, Pernicová Z, Slabáková E et al. Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. *Cytometry A* 2013; 83(5): 472–482. doi: 10.1002/cyto.a.22273.
45. Wylie PG, Bowen WP. Determination of cell colony formation in a high-content screening assay. *Clin Lab Med* 2007; 27(1): 193–199.
46. Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 2002; 20(1): 11–20.
47. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14(1): 3–9. doi: 10.1007/s10911-009-9109-9.
48. Veselská R, Skoda J, Neradil J. Detection of cancer stem cell markers in sarcomas. *Klin Onkol* 2012; 25 (Suppl 2): 2S16–2S20.
49. Mayol JF, Loeuillet C, Hérodin F et al. Characterisation of normal and cancer stem cells: one experimental paradigm for two kinds of stem cells. *Bioessays* 2009; 31(9): 993–1001. doi: 10.1002/bies.200900041.
50. Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential. *Oncol Rep* 2011; 25(1): 289–296.
51. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008; 10(2): R25. doi: 10.1186/bcr1982.
52. Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26(7): 611–623. doi: 10.1007/s10585-009-9260-0.
53. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 2010; 141(4): 583–594. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.020.
54. McDonald SA, Graham TA, Schier S et al. Stem cells and solid cancers. *Virchows Arch* 2009; 455(1): 1–13. doi: 10.1007/s00428-009-0783-1.
55. Lee JT, Herlyn M. Old disease, new culprit: tumor stem cells in cancer. *J Cell Physiol* 2007; 213(3): 603–609.
56. Deleyrolle LP, Harding A, Cato K et al. Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma. *Brain* 2011; 134(Pt 5): 1331–1343. doi: 10.1093/brain/awr081.
57. Willan PM, Farnie G. Application of stem cell assays for the characterization of cancer stem cells. In: Allan AL (ed.). *Cancer stem cells in solid tumors*. Springer 2011: 259–282.
58. Alison MR, Murphy G, Leedham S. Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res* 2008; 331(1): 109–124.
59. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(16): 9118–9123.

Mikroprostředí nádoru – možnosti výzkumu v podmínkách *in vitro*

Tumor Microenvironment – Possibilities of the Research Under *In Vitro* Conditions

Chlapek P.¹, Chovanová S.^{1,2}, Sláviková V.¹, Veselská R.^{1,3}

¹ Laboratoř nádorové biologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

² Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

³ Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

Souhrn

Tumorigeneze je vždy doprovázena změnami v mikroprostředí příslušné tkáně. Nádorové mikroprostředí představuje heterogenní komplex, který širokou škálou vnějších podnětů kontroluje buněčnou proliferaci, diferenciaci, nekrózu nebo apoptózu a může vést k vývoji agresivního fenotypu buněk nádoru. Vliv nádorového mikroprostředí je také často spojován s rezistencí k běžně používaným léčebným postupům. Specifika nádorového prostředí jsou těsně spojena se strukturálními i funkčními abnormalitami cévní sítě v nádoru, stejně jako se změnami v buněčném metabolismu. Pro nádorové tkáně je typické zejména zvýšení podílu glykolýzy, zvýšený příjem glukózy, produkce laktátu a CO₂, rovněž jako přítomnost hypoxických oblastí a oblastí se sníženým pH. V současné době existuje množství metod vhodných pro *in vitro* simulaci a výzkum některých z těchto podmínek a množství nových metod se nadále vyvíjí. Bližší poznání specifík nádorového mikroprostředí tak bude stále více ovlivňovat vývoj nových léčebných prostředků pro nádorová onemocnění u člověka.

Klíčová slova

mikroprostředí nádoru – hypoxie – acidické pH – glukózová deprivace – podmínky *in vitro*

Summary

Tumorigenesis is always accompanied by alterations of the microenvironment in the respective tissue. The tumor microenvironment represents a heterogeneous complex, in which cell proliferation, differentiation, necrosis or apoptosis are regulated by various extracellular stimuli, and it can also lead to development of an aggressive phenotype of tumor cells. Influence of tumor microenvironment is also often connected with resistance to frequently used therapeutic procedures. Specifics of the tumor microenvironment are closely associated with the structural and functional abnormalities of tumor microvessels and altered cellular metabolism. Moreover, changes such as increase in glycolysis, elevated glucose uptake, production of lactate and CO₂, and presence of hypoxic regions and regions with acidic pH are typical features of tumor tissues. At present, there is a lot of methods for *in vitro* simulation and investigation of some of these specific conditions, and a number of new methods are being developed. A detailed understanding of the specifics of the tumor microenvironment should increasingly improve the development of new treatment possibilities of human cancers.

Key words

tumor microenvironment – hypoxia – acidic pH – glucose deprivation – *in vitro* conditions

Práce byla podpořena projektem CEB: OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0183, dále projektem MUNI/C/0944/2013 a Evropským fondem pro regionální rozvoj a státní rozpočet České republiky (RECAMO; CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

This study was supported by project CEB: OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0183), by project MUNI/C/0944/2013 and by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO; CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Petr Chlapek, DiS., Ph.D.
Laboratoř nádorové biologie
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
e-mail: chlapek@sci.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 15. 1. 2014
Přijato/Accepted: 5. 5. 2014

Specifika nádorového mikroprostředí

Původní redukcionistický pohled na biologii solidních nádorů předpokládal, že nádorové onemocnění vzniká pouze v důsledku mutací, které následně způsobují progresi nádoru. Podle této teorie nádorová masa, v jejíchž buňkách se kumulují mutace, existuje víceméně izolovaně a s okolním prostředím ve tkáni komunikuje jen minimálně. Současné pojetí vychází ze skutečnosti, že tkáň nádoru je tvořena buňkami transformovanými i buňkami nenádorovými, což jsou zejména buňky stromální nebo buňky imunitního systému. Tato tkáň přijímá množství signálů ze svého okolí, které v konečném důsledku rozhodují o metabolismu, růstu a přežívání nádorově transformovaných buněk [1,2].

Zatímco přímé vzájemné interakce nádorově transformovaných buněk s buňkami netransformovanými lze v současnosti v systémech *in vitro* zkoumat jen obtížně, při kultivaci nádorových buněk je možné využít úprav kultivačního prostředí tak, aby co nejvíce odpovídalo podmínkám uvnitř nádorové tkáně. V praxi to znamená zejména nižší obsah kyslíku a glukózy v kultivačním prostředí, protože nekontrolovaný růst nádorové masy všeobecně vede k nedostatečnému zásobení jednotlivých buněk kyslíkem a živinami. Současně se jedná o snížené pH kultivačního média, což odpovídá podmínkám v nádorové tkáni, kde je pokles pH způsoben hromaděním odpadních produktů buněčného metabolismu a CO₂ [3]. Buňky nádorové tkáně *in vivo* se s těmito problémy vyrovnávají pomocí specifických změn metabolismu a stimulací neoangiogeneze [4].

Oproti normálně diferencovaným buňkám, které pro získání energie potřebné k buněčnému metabolismu upřednostňují mitochondriální oxidativní fosforylacii, většina nádorových buněk přechází i za přítomnosti kyslíku na glykolýzu – tento fenomén se označuje jako Warburgův efekt [5]. Aerobní glykolýza ovšem představuje ve srovnání s oxidativní fosforylací poměrně neefektivní cestu, jak energii ve formě ATP vyprodukovat. Proto se neustále diskutuje o tom, jaké další výhody může využívání aerobní glykolýzy nádorovým buňkám posky-

tovat. V současné době se má za to, že meziproducty glykolýzy jsou důležité pro biosyntetické procesy, které jsou nezbytné při rychlé proliferaci nádorových buněk [1,6,7]. Navíc produkce a hromadění laktátu přispívá k agresivnímu chování nádoru. Ukázalo se, že tvorba a akumulace laktátu narušuje metabolismus T lymfocytů a tím brání nádorovou tkáň před imunitním systémem. Laktát také funguje jako antioxidant a přispívá tak k rezistenci vůči léčebným postupům, které využívají indukci reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS). Produkce laktátu dále indukuje degradaci extracelulární matrix a usnadňuje tak migraci nádorových buněk. Je také známo, že laktát je schopen indukovat angiogenezi [8–11].

Cévní zásobení nádorové tkáně se vyznačuje typickou chaotickou architekturou, postrádá lymfatické cévy a kromě jiného je také často příčinou vyššího tlaku v nádorové tkáni [12]. Neoangiogeneze tedy problémy v zásobování nádorové tkáně řeší jen částečně a chaotická architektura v kombinaci s relativně častými přestavbami cévního řečiště přispívá k heterogenitě nádorové tkáně. Pro nádorové mikroprostředí jsou charakteristické vlastnosti hypoxie, extracelulární acidóza a nedostatek glukózy, k nimž dochází právě v důsledku nedostatečného cévního zásobení. I z hlediska těchto podmínek je však nádorová tkáň značně heterogenní a jednotlivé oblasti nádoru se v uvedených parametrech mohou navzájem značně lišit [13].

Měření parametrů mikroprostředí v podmínkách *in vivo*

V minulosti bylo pH nádorové tkáně v podmínkách *in vivo* měřeno pomocí skleněných nebo ocelových mikroelektrod, nevýhodou těchto přístupů však byla jejich invazivita [14]. V současnosti jsou proto upřednostňovány neinvazivní metody, zejména pozitronová emisní tomografie (PET), magnetická rezonance (MRI), popřípadě optické měření s využitím fluorescenčně značených sond [14,15]. Obdobně tomu je i u měření parciálního tlaku kyslíku, kdy se místo jehlových elektrod [16] dnes využívají metody PET a MRI v kombinaci s exogenními, popř. endogenními markery. Jako exogenní markery

jsou užívány nitrožilně nebo i orálně aplikované značené nitroaromatické sloučeniny. O nich je známo, že v buňkách dochází k redukci jejich nitro-skupin na amino-skupiny, což je proces sice běžný, ovšem za nepřítomnosti kyslíku nevratný. Jako endogenní markery slouží proteiny, jejich exprese je spojena s přítomností nebo nepřítomností kyslíku a lze je detekovat např. v plazmě, krvi nebo imunohistochemicky v nádorové tkáni získané biopsií [17,18]. Pomocí PET a MRI, nejčastěji s využitím značených analogů příslušných sloučenin, se také stanovuje metabolická spotřeba glukózy, aminokyselin nebo lipidů v nádorové tkáni [19,20].

Změny obsahu kyslíku v nádorové tkáni

V lidských orgánech se koncentrace kyslíku výrazně liší mezi jednotlivými tkáněmi. V dobře prokrvených orgánech (např. játra, ledviny, srdce) se koncentrace kyslíku pohybuje v rozmezí 4–14 %. Oproti tomu v relativně málo prokrvených orgánech, kam patří mozek (0,5–7 %), oko (1–5 %) či kostní dřev (0–4 %), jsou hodnoty nižší [21]. Hodnocení, kdy se v nádorovém mikroprostředí již jedná o hypoxii, je tedy třeba vždy porovnávat k okolní tkáni.

Hypoxie je jedním z nejtypičtějším jevů charakterizujících nádorovou tkáň. Asi polovina solidních nádorů bez ohledu na velikost a jiné parametry obsahuje hypoxické oblasti, které vznikají v důsledku exponenciální proliferace nádorových buněk v kombinaci se specifickou strukturou cévního řečiště [22]. Vzhledem k faktu, že kyslík je schopen ve tkáni difundovat pouze do vzdálenosti kolem 100 μm, se během růstu nádoru neustále zvyšuje nerovnováha mezi přísunem a spotřebou kyslíku [23–25].

Hypoxie výrazně ovlivňuje všechny metabolické procesy v buňce – a to nejen způsob využívání glukózy a s tím spojený výše popsaný Warburgův efekt, ale je také příčinou využívání alternativních zdrojů energie, jako např. aminokyseliny glutaminu [5]. Dalším metabolickým procesem, který je spojován s hypoxií, je *de novo* syntéza mastných kyselin. Ta se u většiny nenádorových buněk vyskytuje jen ojediněle [26]. To je pro buňky nádoru jedna z možností, jak ovlivňovat

redoxní rovnováhu porušenou zvýšenou glykolýzou [27]. V případě vyšší exprese syntázy mastných kyselin byla zjištěna korelace s agresivitou nádorového fenotypu [28]. Hypoxie také indukuje nebo naopak potlačuje expresi množství genů, které hrají důležitou roli v procesech angiogeneze, nádorové progresy, metastazování nebo při produkci glykolytických enzymů, růstových faktorů a transkripčních faktorů. Velmi často se tak děje prostřednictvím transkripčního faktoru HIF-1 α [29]. Již dlouho je také známo, že hypoxické nádorové buňky jsou 3–5krát rezistentnější k ionizujícímu záření v porovnání s normoxií. To souvisí se schopností kyslíku vytvářet následkem ionizujícího záření ROS, které poškozují membrány buněk a mohou způsobovat i dvouřetězcové zlomy v molekule DNA. V hypoxických podmínkách tak není tvorba ROS pro efektivitu terapie dostačující [30–32]. Stejným způsobem hypoxie zvyšuje rezistenci k některým léčivům, jako je cyklofosamid, karboplatina nebo melphalan [33].

Možnosti navození hypoxie v podmínkách *in vitro*

Pro experimentální dosažení krátkodobého maximálního anoxického efektu je možné použít směs plynů 95% N₂/5% CO₂ a inkubaci ve fosfátovém pufru s přísadkou EC Oxyrase, což je biokatalytická agens redukcující zbytkový kyslík v inkubačním roztoku [34,35]. Nejčastější způsob, jak v laboratoři zajistit hypoxické podmínky, je využití hypoxické komůrky, popřípadě inkubátoru s možností úpravy a monitorování obsahu kyslíku v kultivační atmosféře. Inkubace při hladinách kritické hypoxie (1% O₂) se často využívají při výzkumu kmenových buněk, neboť hypoxie potlačuje diferenciaci a je považována za významnou vlastnost tzv. niche kmenových buněk [21,36], tedy specifického mikroprostředí okolo kmenových buněk, které se podílí na udržení biologických vlastností těchto buněk, zejména schopnosti sebeobnovy [37,38]. Stejně tak je hypoxie studována v souvislosti s hypotézou nádorových kmenových buněk a jejich mikroprostředí [39,40]. Tato teorie předpokládá existenci určité populace nádorových buněk s některými vlastnostmi buněk kmenových. Tyto vlastnosti, jako je vlastní niche, nižší frekvence

proliferace a naopak schopnost produkovat rychle se dělící progenitorové buňky, činí tyto buňky často rezistentní ke konvenční terapii.

Změny pH v nádorové tkáni

Další charakteristickou vlastností nádorové tkáně je alkalické intracelulární pH (pHi) s hodnotami v rozmezí 7,0–7,4 a kyselá extracelulární pH (pHe), jehož hodnoty dosahují 6,2–7,0 [41]. U nenádorových tkání je tomu naopak – hodnoty pHi se pohybují v intervalu 6,99–7,2 a hodnoty pHe okolo 7,4 [42,43]. Acidifikace nádorového mikroprostředí je přisuzována slabě rozvinuté cévní síti v nádorové tkáni a akumulaci kyseliny mléčné, což je produkt aerobní glykolýzy, v extracelulárním prostoru [44]. Dalším významným zdrojem acidity v hypoxickém prostředí je CO₂ [13,45], který je přeměňován pomocí anhydrázy kyseliny uhličitě na hydrogenuhličitán a proton. Kyselá pHe v okolí nádoru je spojeno s jeho progresí, konkrétně se zvýšenou produkcí angiogenních faktorů a proteáz, s pozměněnou transkripcí genů a se zvýšením invazivity nádoru [46]. Nízké pH a nahromaděná kyselina mléčná také ovlivňuje imunitní reakci organismu, neboť T lymfocyty podobně jako nádorové buňky upřednostňují glykolýzu i za přítomnosti kyslíku a přebytečné kyseliny mléčné se zbavují transportem do okolí díky koncentračnímu gradientu. V nádorovém prostředí je ovšem tento gradient zablokovaný a kyselina mléčná uvnitř T lymfocytů narušuje jejich metabolismus a znemožňuje tak jejich správnou funkci [47]. Snížené pHe také přispívá k nestabilitě genomu, a to hlavně kvůli poškození reparačních mechanismů. V podmínkách *in vitro* se potvrdilo, že buňky vystavené kyselému pH a hypoxii vykazovaly nižší schopnost reparace ve srovnání s buňkami kultivovanými v normoxických podmínkách. Příčinou je inhibiční působení nízkého pH a nízkého pO₂ na reparační systém N-ER (nucleotide excision repair) [48]. Další genomové změny jsou zapříčiněny klastogenním působením kyselého pH, které může způsobit zlomy DNA, výměny chromatid a přestavby chromozomů [49]. V nádorovém prostředí se rovněž často vyskytují buňky s poruchou reparačního systému MMR (DNA mismatch repair), jež

jsou náchylnější ke vzniku spontánních mutací. Důvodem jejich zvýšeného výskytu je skutečnost, že buňky s touto poruchou jsou rezistentní k apoptóze vyvolané hypoxií nebo nízkým pH [46]. Kyselý charakter nádorového mikroprostředí je spojován také s rezistencí nádorových buněk k některým chemoterapeutikům. Může za to fakt, že množství chemoterapeutik se do buněk dostává v neutrální formě a díky působení kyselého pH dochází k protonaci chemoterapeutických činidel a tím ke znemožnění jejich prostupu přes cytoplazmatickou membránu. Mezi takto ovlivněná chemoterapeutika patří např. vinkristin a doxorubicin [44]. V nádorovém mikroprostředí *in vivo* je tedy jejich příjem buňkou snížen a pacient se stává k daným léčivům rezistentním. V současnosti se proto využívají různé přístupy, jak takovému lékové rezistenci překonat – patří k nim např. alkalizace nádorového mikroprostředí nebo enkapsulace léčiv do micel [25].

Možnosti navození změn pH v podmínkách *in vitro*

Pro navození acidických podmínek se v systémech *in vitro* využívá především upravené médium, v kterém jsou buňky kultivovány za jinak standardních podmínek. Do média se přidává specifický organický pufrovací systém, aby v kultivačních podmínkách (37°C/5% CO₂) bylo udrženo žádané pH. Nejčastěji se pH upravuje na hodnoty v rozmezí pHe 6,5–6,8 pomocí NaOH a HCl. Pro výzkum působení alkalického prostředí používají různí autoři rozdílné hodnoty pH i odlišné pufrы.

Popsáno bylo např. použití 15mM MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) a Bis-Tris při výzkumech vlivu nízkého pH na vznik chromozomálních aberací [49,50]; 25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) [48] a 25 mM MOPS (4-morpholinepropanesulfonic acid); 20 mM HEPES, 20 mM MES a 10 mM tricinI [41] a také 25 mM NaHCO₃ [13].

Změny koncentrace glukózy v nádorové tkáni

Specifickým rysem nádorového mikroprostředí je glukózový deficit. Zatímco průměrná koncentrace glukózy v krvi se typicky pohybuje okolo 1 220 nmol/g,

tj. asi 5,6 nmol/l, v nádorové tkáni byly zaznamenány hodnoty několikanásobně nižší [51,52]. Hlavní příčina tohoto deficitu je nedostatečné prokrvení nádorové tkáně způsobené chaoticky řízenou angiogenezí. Další příčina může být vyšší spotřeba glukózy, ze které nádorové buňky získávají energii častěji glykolýzou než oxidativní fosforylací, a proto jí na stejné množství získané energie spotřebují více. Zvýšená spotřeba glukózy má i přímou souvislost s hypoxií, neboť některé enzymy důležité pro glykolýzu jsou regulovány transkripčním faktorem HIF-1 [25]. Metabolismus glukózy a s ním spojené hromadění laktátu může mít nejen vliv na agresivní chování nádoru a případnou léčbu, jak bylo zmíněno výše, ale glukózová deprivace v kombinaci s hypoxií a nízkým pH může na progresi a expanzi nádoru působit i bezprostředně, protože většina buněk vznikajícího nádoru není schopna se těmto změněným podmínkám přizpůsobit a typickým výsledkem je tak buď indukce nekrózy, nebo apoptózy. Výše zmíněné nádorové kmenové buňky ovšem mohou tuto selekci přežít a v kombinaci s rezistencí k léčbě pak představují potenciální riziko recidivy onemocnění. Identifikace takovýchto buněk a pochopení specifík jejich biologických vlastností otevírá nové perspektivy v protinádorové terapii [25,53–55].

Možnosti navození změn koncentrace glukózy v podmínkách *in vitro*

Vliv snížené hladiny glukózy na nádorově transformované buňky je nejčastěji studován pomocí inkubace v bezglukózovém médiu pouze s přidávkem fetálního telecího séra (10–15 %) se sérovým obsahem glukózy [56,57], nebo s přidáním glukózy v nižším množství, než je v běžném médiu s nízkým obsahem glukózy (5 mM). Například Raffaghello et al [58] popisují, že prostředí se sníženým množstvím glukózy (2,5 mM) může chránit savčí buňky před vysokými dávkami oxidativního poškození nebo před působením chemoterapeutik. Další možností studia je využití některých induktorů proteinů regulovaných glukózou (GRP), jako jsou např. deoxyglukóza, glukosamin či Calimycin A23187 [59].

3D kultivace

V poslední době se výzkumu nádorového mikroprostředí *in vitro* otevírají nové možnosti v podobě kultivací v 3D strukturách. Výhoda takových kultivací je možnost simulovat nejen biochemické faktory, ale zároveň i mechanické podněty, u kterých bylo také zjištěno, že jejich modifikace může mít vliv na buněčný růst, migraci a invazivitu stejně jako na proliferaci a apoptózu [60]. Pochopitelně nejpresnější simulací 3D prostředí je kultivace s využitím kompletních organismů nebo jejich embryí. Mezi úskalí těchto přístupů ovšem patří nemožnost přesně definovat kultivační prostředí, nesnadné zobrazování kultivovaných buněk a také s těmito přístupy spojené otázky ekonomické a etické. V prostoru mezi 2D kultivačními modely a využitím kompletních organismů se tak lze setkat nejčastěji s kultivacemi formou buněčných sfér a nebo s různými modely tkáňového inženýrství [61].

Tkáňové inženýrství bylo původně rozvíjeno ve snaze vyvinout funkční náhražky tkání a orgánů. To vedlo k vytvoření 3D matic a lešení, na která jsou v laboratoři nanášeny různé typy buněk za přítomnosti požadovaných růstových faktorů [62]. Lešení imituje podmínky přirozeně se nacházející v extracelulární matrix, což umožňuje buňkám nabyt přirozený tvar a zajistit přirozenou tkáňovou organizaci [63]. Tyto 3D kultivace rychle zaujaly své místo ve výzkumu, kde jsou využívány především pro sledování angiogenních a tumorigenních mechanismů nádoru [62].

Buněčné sféry jsou v porovnání s tkáňovým inženýrstvím jednoduché 3D modely, založené na schopnosti adhezních buněk agregovat. Tyto modely nevyžadují lešení a mohou být jednoduše pozorovány mikroskopem. Svoje uplatnění nacházejí především v modelaci růstu solidních nádorů a studiu schopností metastazovat [64]. Nevýhodou sfér je neschopnost transportu látek a tak se díky hladovění a toxicitě nahromaděných metabolitů ve sférách větších než 1 mm tvoří centra s odumřelými buňkami [63].

Problém s transportem látek, přísunem kyslíku a živin v 3D kulturách v současnosti řeší bioreaktory. Tyto přístroje

jsou integrovány s výše uvedenými 3D modely a umožňují přesnou a reprodukovatelnou kontrolu podmínek požadovaných při kultivaci, jako je teplota, pH, střední průtok, hladina kyslíku, přívod živin nebo odstranění metabolitů [63].

Ačkoliv mají přístupy 3D kultivace stále ještě některé limity, oproti běžným 2D kultivacím v podmínkách *in vitro* jsou schopny poskytovat informace, které mnohem lépe reflektují specifika biologie solidních nádorů, a to navíc rychleji a levněji v porovnání se zvířecími modely.

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* 2002; 12(4): 261–266.
3. Weinberg RA. *The biology of cancer*. New York: Garland Science 2007.
4. Gillies RJ, Morse DL. *In vivo* magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annu Rev Biomed Eng* 2005; 7: 287–326.
5. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev* 2012; 26(9): 877–890. doi: 10.1101/gad.189365.112.
6. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930): 1029–1033.
7. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13(6): 472–482.
8. Hamanaka RB and Chandel NS. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J Exp Med* 2012; 209(2): 211–215.
9. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 441–464. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
10. Meijer TW, Kaanders JH, Span PN et al. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clin Cancer Res* 2012; 18(20): 5585–5594. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0858.
11. Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res* 2011; 71(22): 6921–6925. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1457.
12. Cairns R, Papandreou I, Denko N. Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* 2006; 4(2): 61–70.
13. Helmlinger G, Sckell A, Dellian M et al. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res* 2002; 8(4): 1284–1291.
14. Volk T, Jähde E, Fortmeyer HP et al. pH in human tumour xenografts: effect of intravenous administration of glucose. *Br J Cancer* 1993; 68(3): 492–500.
15. Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med* 2010; 51(8): 1167–1170. doi: 10.2967/jnumed.109.068981.
16. Höckel M, Schlenger K, Knoop C et al. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991; 51(22): 6098–6102.
17. Rademakers SE, Span PN, Kaanders JH et al. Molecular aspects of tumour hypoxia. *Mol Oncol* 2008; 2(1): 41–53. doi: 10.1016/j.molonc.2008.03.006.

18. Zhu W, Dai M, Xu Y et al. Novel nitroheterocyclic hypoxic markers for solid tumor: synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem* 2008; 16(6): 3255–3260.
19. Plathow C, Weber WA. Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med* 2008; 49 (Suppl 2): 43S–63S. doi: 10.2967/jnumed.107.045930.
20. Walker-Samuel S, Ramasawmy R, Torrealdea F et al. *In vivo* imaging of glucose uptake and metabolism in tumors. *Nat Med* 2013; 19(8): 1067–1072. doi: 10.1038/nm.3252.
21. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm. *J Cell Physiol* 2009; 219(2): 271–275. doi: 10.1002/jcp.21690.
22. Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 2004; 381: 335–354.
23. Wykoff CC, Beasley N, Watson PH et al. Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Pathol* 2001; 158(3): 1011–1019.
24. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4(11): 891–899.
25. Annibaldi A, Widmann C. Glucose metabolism in cancer cells. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13(4): 466–470. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833a5577.
26. Furuta E, Pai SK, Zhan R et al. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res* 2008; 68(4): 1003–1011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2489.
27. Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ et al. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(18): 9493–9498.
28. Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD et al. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(14): 6379–6383.
29. Glazer PM, Hegan DC, Lu Y et al. Hypoxia and DNA Repair. *Yale J Biol Med* 2013; 86(4): 443–451.
30. Vaupel P, Höckel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(8): 1221–1235.
31. Lemaire L, Howe FA, Rodrigues LM et al. Assessment of induced rat mammary tumour response to chemotherapy using the apparent diffusion coefficient of tissue water as determined by diffusion-weighted (1)H-NMR spectroscopy *in vivo*. *MAGMA* 1999; 8(1): 20–26.
32. Gray LH, Conger AD, Ebert M et al. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; 26(312): 638–648.
33. Teicher BA, Holden SA, Al-Achi A et al. Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations *in vivo* in the FSaIIc murine fibrosarcoma. *Cancer Res* 1990; 50(11): 3339–3344.
34. Saikumar P, Dong Z, Patel Y et al. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* 1998; 17(26): 3401–3415.
35. Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J et al. Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001; 276(22): 18702–18709.
36. Cipolleschi MG, D'ippolito G, Bernabei PA et al. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E *in vitro*. *Exp Hematol* 1997; 25(11): 1187–1194.
37. Cipolleschi MG, Rovida E, Dello Sbarba P. The culture-repopulating ability assays and incubation in low oxygen: a simple way to test drugs on leukaemia stem or progenitor cells. *Curr Pharm Des* 2013; 19(30): 5374–5383.
38. Eliasson P, Jönsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol* 2010; 222(1): 17–22. doi: 10.1002/jcp.21908.
39. Cipolleschi MG, Marzi I, Santini R et al. Hypoxia-resistant profile implies vulnerability of cancer stem cells to physiological agents, which suggests new therapeutic targets. *Cell Cycle* 2013; 13(2): 268–278. doi: 10.4161/cc.27031.
40. Anderson KM, Guinan P, Rubenstein M. Normoxic or hypoxic CD44/CD41 a(2) B(1) integrin-positive prostate PC3 cell side fractions and cancer stem cells. *Med Oncol* 2014; 31(1): 779. doi: 10.1007/s12032-013-0779-1.
41. Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B et al. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(7): 1207–1218.
42. Danhier F, Feron O, Preat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010; 148(2): 135–146. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.027.
43. Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol* 2013; 4: 354.
44. Cukierman E, Khan DR. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(5): 762–770. doi: 10.1016/j.bcp.2010.04.020.
45. Svastova E, Hulikova A, Rafajova M et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 2004; 577(3): 439–445.
46. Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS et al. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 2002; 16(4): 430–450.
47. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007; 109(9): 3812–3819.
48. Yuan J, Narayanan L, Rockwell S et al. Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer Res* 2000; 60(16): 4372–4376.
49. Morita T, Nagaki T, Fukuda I et al. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res* 1992; 268(2): 297–305.
50. Morita T. Low pH leads to sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations, and its clastogenicity is S-dependent. *Mutat Res* 1995; 334(3): 301–308.
51. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M et al. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 2009; 69(11): 4918–4925. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4806.
52. Urasaki Y, Heath L, Xu CW. Coupling of glucose deprivation with impaired histone H2B monoubiquitination in tumors. *PLoS One* 2012; 7(5): e36775. doi: 10.1371/journal.pone.0036775.
53. Seyfried BT, Kiebish M, Marsh J et al. Targeting energy metabolism in brain cancer through calorie restriction and the ketogenic diet. *J Cancer Res Ther* 2009; 5 (Suppl 1): S7–S15. doi: 10.4103/0973-1482.55134.
54. Skinner R, Trujillo A, Ma X et al. Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* 2009; 44(1): 212–216; discussion 216. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.10.042.
55. Jin S, DiPaola RS, Mathew R et al. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 3): 379–383.
56. Hwang JH, Kim JY, Cha MR et al. Etoposide-resistant HT-29 human colon carcinoma cells during glucose deprivation are sensitive to pteridine A, a GRP78 down-regulator. *J Cell Physiol* 2008; 215(1): 243–250.
57. Shen J, Hughes C, Chao C et al. Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(10): 3278–3282.
58. Raffaghello L, Lee C, Safdie FM et al. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(24): 8215–8220. doi: 10.1073/pnas.0708100105.
59. Tomida A, Yun J, Tsuruo T. Glucose-regulated stresses induce resistance to camptothecin in human cancer cells. *Int J Cancer* 1996; 68(3): 391–396.
60. Desmaison A, Frongia C, Grenier K et al. Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids. *PLoS One* 2013; 8(12): e80447. doi: 10.1371/journal.pone.0080447.
61. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(10): 839–845.
62. Horch RE, Boos AM, Quan Y et al. Cancer research by means of tissue engineering – is there a rationale? *J Cell Mol Med* 2013; 17(10): 1197–1206. doi: 10.1111/jcmm.12130.
63. Haycock JW. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol* 2011; 695: 1–15. doi: 10.1007/978-1-60761-984-0_1.
64. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 69–70C: 29–41. doi: 10.1016/j.addr.2014.03.001.

Elektrochemická analýza nukleových kyselin, bílkovin a polysacharidů v biomedicíně

Electrochemical Analysis of Nucleic Acids, Proteins and Polysaccharides in Biomedicine

Bartošík M.¹, Paleček E.^{1,2}, Vojtěšek B.¹

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Brno

Souhrn

Elektrochemická analýza nukleových kyselin, bílkovin i polysacharidů představuje zajímavou, i když zatím méně používanou alternativu ve srovnání se stávajícími metodami založenými zejména na optické detekci. Nabízí totiž relativně levnou, rychlou a přístrojově nenáročnou možnost paralelní detekce na miniaturizovaných čípech, ideální pro personalizovanou medicínu 21. století. Elektrochemie nukleových kyselin umožňuje např. detekci konkrétních sekvencí DNA (pro určení genů, stanovení přítomnosti bakterií a virů, atd.), analýzu poškození DNA a interakcí s jinými molekulami, DNA metylaci, nebo detekci mikroRNA jako nádorových biomarkerů. V elektrochemii bílkovin je v současnosti kladen důraz zejména na konstrukci tzv. imunosenzorů schopných detekce konkrétních proteinů (antigenů) pomocí jejich vazby na protilátku, s potenciálem pro diagnostiku. Z biofyzikálního hlediska je zajímavý vlastní elektrokatalytický signál bílkovin citlivý k jejich konformačním změnám, který by mohl nalézt uplatnění při rozlišení mutantních forem proteinů (např. u p53) nebo při jejich agregaci (α-synuklein u případě Parkinsonovy nemoci), popřípadě při studiu interakcí s nízkomolekulárními látkami či DNA. Díky zvýšenému zájmu o glykoproteiny se začínají objevovat elektrochemické práce zabývající se detekcí oligosacharidů a polysacharidů (tzv. glykanů, pokud jsou součástí bílkovin), a to pomocí elektroaktivních značek specifických pro sacharidy anebo konstrukcí lektinových biosenzorů využívajících lektinů, které se silně vážají právě na glykany. Elektrochemická analýza se tak jeví jako zajímavý nástroj v současném výzkumu na poli genomiky, proteomiky i glykomiky, včetně diagnostiky nádorových onemocnění.

Klíčová slova

elektrochemie – elektrody – hybridizace nukleových kyselin – DNA senzory – elektrokatalýza – biologické markery

Summary

Electrochemical analysis of nucleic acids, proteins and polysaccharides represents an interesting, although not widely spread alternative to current methods based predominantly on optical detection because it offers a relatively inexpensive, fast and instrumentally simple detection of parallel samples on miniaturized chips, ideal for personalized medicine of the 21st century. Nucleic acid electrochemistry enables, for example, detection of specific DNA sequences (for determination of genes or presence of bacteria and viruses, etc.), DNA damage analysis and interaction with other molecules, DNA methylation or detection of microRNAs as potential cancer biomarkers. In the electrochemistry of proteins, great emphasis is put on construction of immunosensors for capturing specific proteins (antigens) using antibodies, suitable for diagnostics. From a biophysical point of view, intrinsic electrocatalytic signal of proteins sensitive to conformational changes could be useful in discrimination of mutant proteins (e.g. p53), native and aggregated forms (α-synuclein in Parkinson's disease) or for studies of protein interactions with low molecular-weight ligands and DNA. Due to an increased interest of scientists in glycoproteins, new electrochemical papers emerged aiming at detection of oligosaccharides and polysaccharides (i.e. glycans, when part of the protein). These assays employ for instance electroactive labels specific for saccharides or lectin biosensors using lectins which strongly bind glycans. Electrochemical analysis thus appears as an interesting tool in current genomics, proteomics and glycomics, as well as for cancer diagnostics.

Key words

electrochemistry – electrodes – nucleic acid hybridization – DNA sensors – electrocatalysis – biological markers

Práce byla podpořena grantem GA ČR P301/11/2055 (EP), GA ČR 14-24931P (MB) a Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the Czech Science Foundation projects No. P301/11/2055 (to EP) and 14-24931P (to MB), by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Martin Bartošík, Ph.D.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: martin.bartosik@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 15. 1. 2014

Přijato/Accepted: 27. 2. 2014

Úvod

V souvislosti s obrovským pokrokem v biomedicíně v posledních letech jsou vyvíjeny nové metody analýzy a detekce nukleových kyselin (NK), bílkovin i polysacharidů – metody, které by byly levnější, vyžadovaly jednodušší vybavení a dokázaly rychle a paralelně analyzovat co nejmenší objemy vzorků. Z těchto důvodů se v biomedicinském výzkumu čím dál víc používají i metody založené na elektrochemické detekci, které mají naději tato kritéria splnit. V současnosti v laboratořích zaměřených na onkologický výzkum převládají zavedené a dobře známé optické techniky (mikroskopie, různé spektroskopické metody atd.) využívající detekci světla nebo jiného elektromagnetického záření. U elektrochemie je princip poněkud odlišný – zjednodušeně řečeno je studován přenos elektronů mezi analyzovanou látkou rozpuštěnou ve vodním prostředí a elektrodou do tohoto prostředí ponořenou. Látka může od elektrody elektrony přijímat (redukovat se) anebo je elektrodě odevzdávat (oxidovat se), přičemž se tento přenos elektronů projeví změnou sledovaného signálu (obvykle vznikem tzv. píku). Na základě toho lze zjistit např. přítomnost dané látky v prostředí (a dle velikosti signálu i její koncentraci) nebo studovat její strukturu či interakci s jinými molekulami. I když je elektrochemie používána spíše pro detekci nízkomolekulárních látek (existuje řada elektrochemických senzorů např. pro detekci etanolu v alkohol testerech, oxidu uhelnatého v plynových detektorech anebo glukózy v glukometrech), čím dál více prací se zabývá i studiem biomakromolekul. Velkou

roli ve vývoji elektrochemie sehrál významný český vědec Jaroslav Heyrovský, držitel Nobelovy ceny za objev polarografie, předchůdkyně dnešních moderních elektrochemických technik. Česká elektrochemie má proto velikou tradici a dobré jméno v zahraničí a není náhoda, že mnoho objevů bylo učiněno právě na „domácí půdě“. V následujících řádcích bychom rádi shrnuli historii i současné možnosti a trendy v elektrochemickém výzkumu NK, bílkovin a v neposlední řadě i polysacharidů, zejména v souvislosti s glykoproteiny.

Nukleové kyseliny

Krátce po objevu struktury dvojité šroubovice DNA v roce 1953 [1], kdy vzrostl zájem o chemické i biologické vlastnosti DNA, se zdálo, že DNA a RNA jsou polarograficky inaktivní, a tudíž pro elektrochemii nepoužitelné [2]. V témže roce však jeden z nás (EP), který pracoval jako asistent/aspirant (dnes Ph.D. student) na Biofyzikálním ústavu ČSAV v Brně, získal výsledky ukazující, že všechny báze, DNA i RNA jsou polarograficky aktivní a lze je elektrochemicky stanovit v relativně nízkých koncentracích [3]. Ukázalo se, že adenin (A) a cytosin (C) poskytují redukční signály, zatímco guanin (G) poskytuje při (cyklické) oscilografické polarografii anodický signál, odpovídající oxidaci redukčního produktu guaninu. V roce 1960 vyšla v časopisu Nature práce ukazující, že za elektrochemické signály DNA jsou odpovědní redukční a oxidační elektrodové děje bází (A, C, G) a že tyto signály reflektují změny ve struktuře DNA, při nichž se mění dostupnost bází pro elektrodové interakce [4]. Možná nebylo překvapivé, že

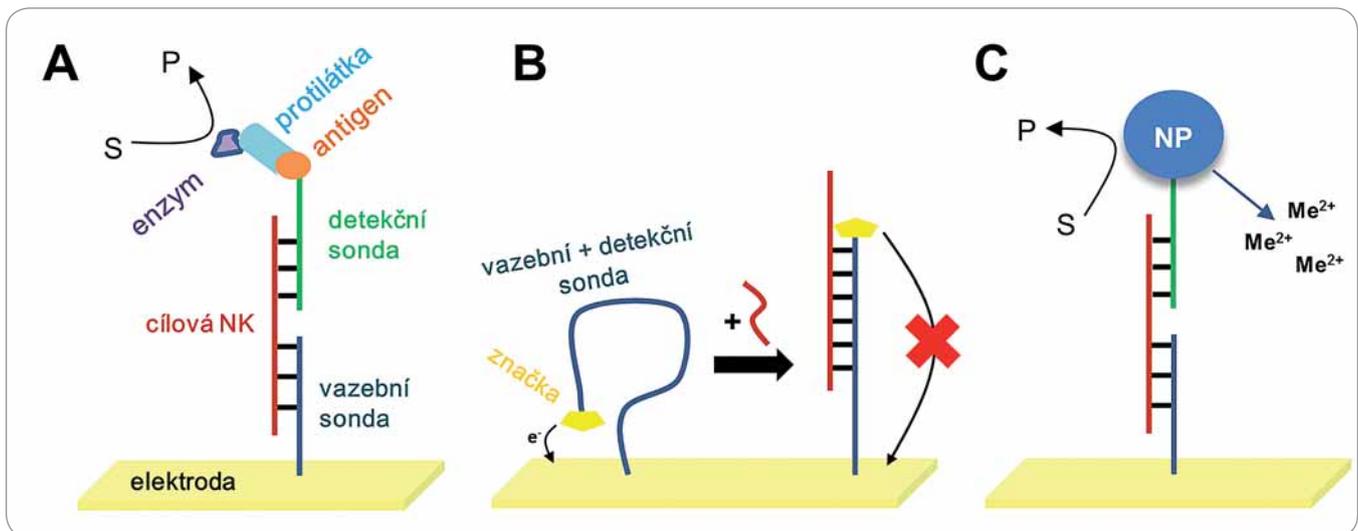
tato práce vyšla rok po udělení Nobelovy ceny J. Heyrovskému a krátce před udělením téže ceny J. Watsonovi, F. Crickovi a M. Wilkinsovi (1962) za objev struktury DNA. Určitě stojí za zmínku, že získané výsledky by nevznikly bez přístroje pro oscilografickou polarografii, který v té době zakoupil Vladimír Morávek, profesor biochemie na Masarykově univerzitě a zakladatel výzkumných laboratoří Masarykova onkologického ústavu v Brně.

Po více než 30 let byla elektrochemie nukleových kyselin poměrně malé vědecké pole, na kterém pracovalo asi 10 laboratoří, převážně v Evropě. Brněnská laboratoř vedená EP představovala v té době světové centrum v dané oblasti, ze kterého vyšla řada důležitých objevů a zjištění [5–10], z nichž mnohé jsou využívány dodnes. Některé z nich jsou uvedeny v tab. 1. Po roce 1990 se začal počet laboratoří zabývajících se elektrochemií DNA zvyšovat a došlo k prudkému nárůstu publikací v této oblasti vědy, dosahujícímu až přibližně 700 článků ročně.

Pravděpodobným důvodem tohoto nárůstu byl výrazný pokrok v genomice související zejména s dokončením projektu lidského genomu (Human Genome Project). Jakmile totiž vědci znali sekvenci mnoha genů odpovědných za vznik dědičných chorob anebo rakoviny (tzv. onkogenů anebo nádorových supresorových genů), nebyl pak problém syntetizovat sondy DNA s komplementární sekvencí, které by tyto cílové geny navázaly (v procesu hybridizace) a tuto hybridizaci detekovali pomocí různých technik právě včetně elektrochemie. Postupně se vyvinulo množství sofistikovaných přístupů cílených na zlepšení citlivosti nebo reprodukovatelnosti analýz (obr. 1) [11]. Jedná se třeba o analogii známé ELISA, kdy cílová NK nejdříve hybridizuje s vazebnou sondou a následně jiná část této cílové NK hybridizuje s další DNA sondou (tzv. detekční nebo reportérovou sondou), která bývá značena antigenem (obr. 1A). Po vytvoření „sendviče“ se do směsi přidává primární protilátka vůči danému antigenu a následně sekundární protilátka konjugovaná s enzymem (jež se váže na primární protilátku) a elektrochemicky se sleduje enzymatická reakce. Signál z enzymatické reakce (obvykle oxidace nebo

Tab. 1. Některá důležitá zjištění v elektrochemii nukleových kyselin do roku 1990.

Rok		Literatura
1962–1966	rozlišení dvouřetězcové a jednořetězcové DNA	[5]
1967	detekce poškození DNA	[6]
1967	interakce DNA s nízkomolekulárními ligandy	[7]
1978	použití pevných elektrod (uhlík)	[8]
1981–1983	značení DNA elektroaktivní látkou	[9]
1986	DNA-modifikované elektrody	[10]



Obr. 1. Nejčastěji používané strategie pro detekci konkrétních sekvencí nukleových kyselin (NK) v hybridizačních senzorech.

A. Sendvičová strategie využívající dvě sondy: vazebnou sondu připevněnou na elektrodu a antigenem značenou detekční sondu pro vazbu protilátky konjugované s enzymem. Elektrochemicky je detekován produkt enzymatické reakce. B. Molekulární „maják“ s jedinou značenou sondou imobilizovanou na povrch elektrody. Cíllová NK mění konformaci vazebné sondy a ovlivňuje výsledný signál. C. Sendvičová strategie, kde se namísto protilátky používají nanočástice (nanoparticles – NP); ty mohou katalyzovat reakci za vzniku elektroaktivního produktu, anebo v případě kovových NP je možné detekovat kationty kovů po jejich rozpuštění.

redukce nějakého vhodného substrátu) pak značí přítomnost cílové NK; nejčastěji používanými enzymy jsou alkalická fosfatáza či křemenná peroxidáza.

Poněkud jednodušší je tzv. „molekulární maják“ (molecular beacon), což je speciální značená DNA sonda zahrnující vazebnou i detekční sondu v jednom (obr. 1B). Tato sonda je navázána na povrch elektrody, přičemž před hybridizací je velmi flexibilní. Díky ní se připojená elektroaktivní značka na konci sondy nachází relativně blízko povrchu elektrody a její signál je tudíž vysoký. Po hybridizaci s cílovou NK mění sonda konformaci, je „narovnanější“ a značka se dostává dál od elektrody, čímž signál klesá.

V poslední době se i v elektrochemii NK čím dál častěji uplatňují nanotechnologie (obr. 1C). Oblíbeným přístupem je např. aplikace anorganických nanočástic (kovové, magnetické, polovodičové atd.), které mohou sloužit jako elektroaktivní značky nebo jako katalyzátory chemických reakcí. Pro modifikaci elektrodových povrchů se používají uhlíkové nanotrubičky nebo grafén (Nobelova cena, 2010), jejichž výhodou je velký poměr plocha/objem vedoucí k výrazné amplifikaci signálu (s rostoucí plochou roste i počet přenesených elektronů z/do elektrody).

Výše zmíněné strategie byly použity pro detekci onkogenů a tumor supresorových genů [12–14], jednonukleotidového polymorfismu (single nucleotide polymorphism, např. u hemochromatózy) [15], repetitivních sekvencí (tzv. tripletová expanze typická pro Huntingtonovu chorobu nebo myotonickou dystrofii) [16,17], virových či bakteriálních NK [18–20] anebo geneticky modifikovaných organismů [21].

Využití v onkologickém výzkumu

Existuje celá řada potenciálních možností použití elektrochemie NK v onkologickém výzkumu. Zajímavá aplikace je třeba studium interakce DNA s protinádorovými léčivy. Léky jako cisplatin, daunomycin anebo mitomycin poškozují DNA, přičemž toto poškození se často projeví změnou elektrochemického signálu DNA [22]. Brabec vyvinul jednoduchý elektrochemický biosenzor na bázi uhlíkových elektrod, který monitoruje pokles oxidačního píku guaninu po navázání platinovaných derivátů [23]. Mnohdy i samotná léčiva (zejména organokovové sloučeniny jako platinované deriváty) dávají výrazný elektrochemický signál a namísto píku DNA je analyzován signál pocházející od léčiv [24]. Tyto přístupy se dají

využít např. pro studium molekul, které by mohly být potenciálními léčivy, ale jejich vazba na DNA nebyla doposud prostudována.

Další důležitou oblastí je elektrochemické studium metylace DNA. Methylace představuje epigenetickou modifikaci (methylace cytozinu na 5-uhlíku; vzniká metylcytozin) hrající roli v genové expresi [25], přičemž změněné metylační vzorce u DNA bývají asociované s karcinogenezi. Bylo publikováno několik strategií, jak elektrochemicky rozlišit metylovanou a nemetylovanou DNA. Používá se třeba reakce s hydrogensířičitanem sodným, který deaminuje cytozin na uracil, zatímco metylcytozin zůstává nezměněn. Po vhodné volbě primerů je následně provedena amplifikace metylované nebo nemetylované DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR), u které je uracil amplifikován jako thymin a metylcytozin jako cytozin, a elektrochemická detekce použitím vhodných redoxních značek [14,26]. Jednodušší varianta je přímé rozlišení metylované a nemetylované DNA bez nutnosti PCR amplifikace, pouze na základě rozdílných elektrochemických vlastností cytozinu a metylcytozinu [27,28]. Tento přístup se však v současné době jeví jako málo citlivý,

vyžadující mikromolární množství DNA. Nedávno jsme vyvinuli jednoduchou metodu pro rozlišení metylované a nemetylované DNA použitím hydrogen-siřičitanu sodného, avšak bez nutnosti PCR [29]. Využili jsme při tom toho, že uracil je na rtuťových elektrodách neredukovatelný, zatímco metylcytozin ano. Metylovaná DNA proto po reakci s hydrogen-siřičitanem sodným poskytovala vyšší signál než nemetylovaná DNA.

Mnoho práce bylo vykonáno i na poli RNA. Molekuly jako mRNA a mikroRNA (miRNA) slouží jako biomarkery některých typů nádorů, protože úzce souvisí s expresí onkoproteinů nebo nádorových supresorů [30]. Byla např. vyvinuta metoda elektrochemické detekce mRNA pro interleukin-8 přímo ve slinách pro včasnou diagnostiku rakoviny ústní dutiny [31]. Detekce byla provedena použitím molekulárního majáku, přičemž detekční limit byl slibných 0,4 fM. Mnohem více prací však existuje pro elektrochemickou detekci miRNA (krátkých RNA molekul) využívajících dva rozdílné mechanismy posttranskripční regulace genové exprese, které vedou buď k degradaci cílové mRNA, nebo k repressi její translace [11,32]. Nejčastější přístup elektrochemické detekce miRNA je již zmíněná sendvičová metoda využívající dvě DNA sondy (obr. 1, stejná strategie, pouze namísto DNA je detekována RNA) a některý ze způsobů značení pro amplifikaci signálu, např. enzymatické [33–35] nebo nanočásticové [36]. Existují i další strategie, třeba jednodušší a levnější metoda bez amplifikace signálu využívající značení miRNA pomocí elektroaktivního komplexu na bázi šestimocného osmia [37,38]. U této metody je vazebná sonda DNA připevněna na magnetické kuličky a značená komplementární miRNA je po hybridizaci a důkladném promytí uvolněna z kuliček a elektrochemicky stanovena právě díky osmiové značce, která umožňuje detekci pikomolárních koncentrací miRNA. Tento jednoduchý přístup by se mohl uplatnit v rychlé detekci vybraných miRNA, pokud se povede zvýšit citlivost stanovení.

Bílkoviny

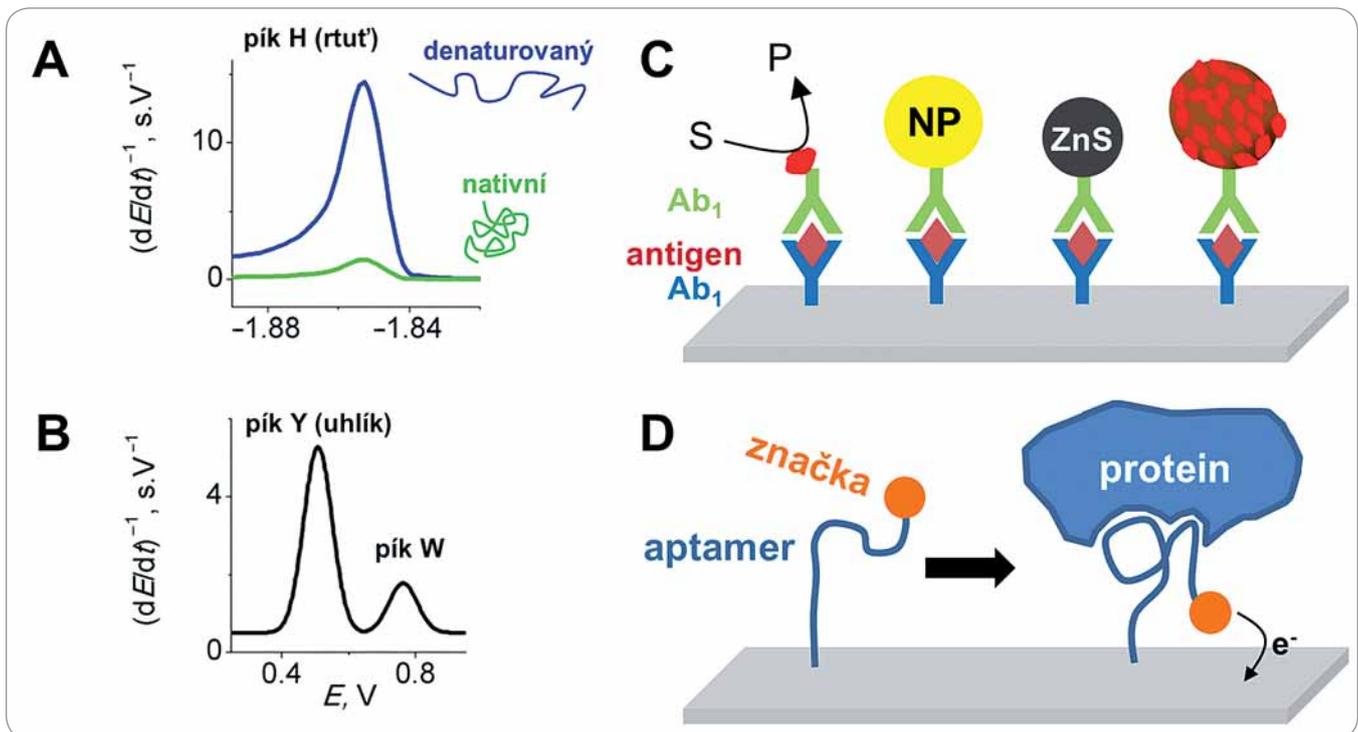
V době, kdy polarograf ještě nebyl komerčně dostupný, se Jaroslav Heyrovský

pokoušel popularizovat polarografii tím, že do své laboratoře zval mladé vědce a ti tam na polarografu prováděli své experimenty. Mezi nimi byli i lékaři Herles a Vančura studující polarografickou aktivitu lidských tělních tekutin [39]. V séru, moči i žluči objevili signál bílkovin, který byl potenciálově asi o 300 mV pozitivnější než redukce sodíkových kationtů, a proto dostal název „prenátriová vlna“. Ve výzkumu prenátriové vlny pokračovali Heyrovský a Babička, kteří ukázali, že tento signál souvisí s katalytickým vylučováním vodíku, přičemž se objevoval v přítomnosti albuminů společně s amoniiovými ionty [40]. Polarografická prenátriová vlna však byla považována za málo vhodnou pro analytické účely, protože se nacházela příliš blízko vylučování základního elektrolytu a byla špatně vyvinutá. V roce 1933 Brdička zjistil, že bílkoviny obsahující zbytky cysteinu poskytují polarografickou dvojvlnu v pufovaných roztocích kobaltu, která byla rovněž způsobena katalytickým vylučováním vodíku, ale byla dobře oddělena od křivky základního elektrolytu. Po několika desetiletí byla Brdičkova katalytická reakce (Brdicka's catalytic reaction – BCR) intenzivně studována, neboť se brzy po jejím objevu jevila jako dobrý nástroj při diagnostiku [41]. Na výzkumech se podílel i Masarykův onkologický ústav (MOÚ) v Brně, včetně prof. V. Morávka a později A. Kočenta, kteří na MOÚ elektrochemickou analýzu bílkovin zavedli a přispěli k jejímu rozvoji. Koncem 60. let minulého století začal zájem o BCR upadat, neboť se objevily nové, specifitější metody v diagnostice rakoviny. BCR v kombinaci s moderními elektrochemickými metodami a stacionárními elektrodami se může však i v současnosti uplatnit při analýze bílkovin, např. metalothioneinů [42]. V posledních letech se ukazuje, že Heyrovského „prenátriová vlna“ ve spojení s elektrochemickou technikou, tzv. chronopotenciometrií konstantním proudem (constant current chronopotentiometric stripping – CPS) a se stacionárními rtuťovými chemicky modifikovanými elektrodami, včetně pevných amalgamových elektrod, může být vhodný nástroj analýzy bílkovin. Rtuťové elektrody totiž nabízejí vysokou citlivost,

zejména pokud se jedná o zmíněnou elektrokatalýzu, při které elektroaktivní aminokyseliny u studovaného proteinu odevzdávají při záporných potenciálech elektrodě protony, čímž dochází ke vzniku a vylučování molekulárního vodíku. Jedná se zvláště o bazické aminokyseliny lysin, arginin a histidin, a taktéž o cystein, jehož katalytické účinky se využívají právě ve výše popsané BCR. Tyto aminokyseliny následně přijímají protony z vodního prostředí, dochází k jejich regeneraci a katalytický cyklus se může opakovat. Protože jedna molekula proteinu generuje mnoho molekul vodíku, je tato metoda vysoce citlivá, umožňující stanovení až subnanomolárních koncentrací proteinů. Důležitou vlastností tohoto katalytického signálu (nazývaného pík H; obr. 2A) je jeho citlivost ke strukturním či konformačním změnám bílkovin, protože často dochází ke snížení nebo zvýšení přístupnosti elektroaktivních aminokyselin k povrchu elektrody, čímž je ovlivněn přenos elektronů. Pomocí píku H byla u bílkovin kupříkladu sledována denaturace [43] nebo agregace [44], interakce s nízkomolekulárními ligandy či DNA [45], strukturní změny v důsledku zavedených mutací [46], či redoxní stav [47] atd.

Kromě rtuťových elektrod poskytují bílkoviny signály i na uhlíkových elektrodách. Je možné monitorovat oxidaci aminokyselinových zbytků tyrozinu a tryptofanu (obr. 2B), a to třeba pro studium interakce DNA-protein [48], pro rozlišení fosforylovaných a nefosforylovaných forem [49], pro studium membránové sodíkové-draslíkové pumpy [50], nebo pro stanovení inzulinu [51] či α -synukleinu (proteinu důležitého při vzniku Parkinsonovy nemoci) [52].

Pro zvýšení citlivosti se k bílkovinám často navazují různé externí značky, popřípadě se sledují redoxní děje kofaktorů (zejména iontů kovů u metaloproteinů), a nikoliv redoxní děje samotných aminokyselin. Značení je zejména účinné při citlivé detekci konkrétních bílkovin, obvykle ve směsi jiných molekul. Pro tyto účely se nejčastěji využívají tzv. imunoeseje (immunoassays) ve formátu ELISA, kdy se hledaný protein (sloužící jako antigen) naváže na pri-



Obr. 2. Elektrochemická analýza bílkovin.

A–B. Vlastní elektroaktivita bílkovin bez nutnosti externího značení na rtuťových (A) a uhlíkových (B) elektrodách. Rtuťové elektrody poskytují elektrokatalytický pík H a jsou vhodné pro rozlišení strukturálních změn v bílkovinech (např. denaturace). Uhlíkové elektrody umožňují sledování oxidace tyrozinu (pík Y) a tryptofanu (pík W) u kratších peptidů (v případě proteinů obvykle dochází ke spojení obou píků do jednoho). C. Různé druhy imunosenzorů s imobilizovanou primární protilátkou a hledaným antigenem. Liší se ve způsobu amplifikace signálu přidáním sekundární protilátky značené např. (zleva doprava) enzymem, nanočásticí (NP), kvantovou tečkou, magnetickou kuličkou pokrytou množstvím enzymových molekul, atd. D. Konstrukce aptasenzoru využívající změnu konformace značeného aptameru po navázání proteinu, což vede k zvýšení signálu.

mární protilátku imobilizovanou na povrchu elektrody (imunosenzoru) a na takto vzniklý komplex se naváže sekundární protilátka konjugovaná s enzymem katalyzujícím elektrochemicky detekovatelnou reakci (obr. 2C) [53–55]. Podobně jako u NK se i v detekci bílkovin používají v stále větší míře nanotechnologie (nanočástice, nanotrubičky atd.), které ještě více zvyšují citlivost detekce, někdy až na femto- či dokonce attomolární úroveň [56,57].

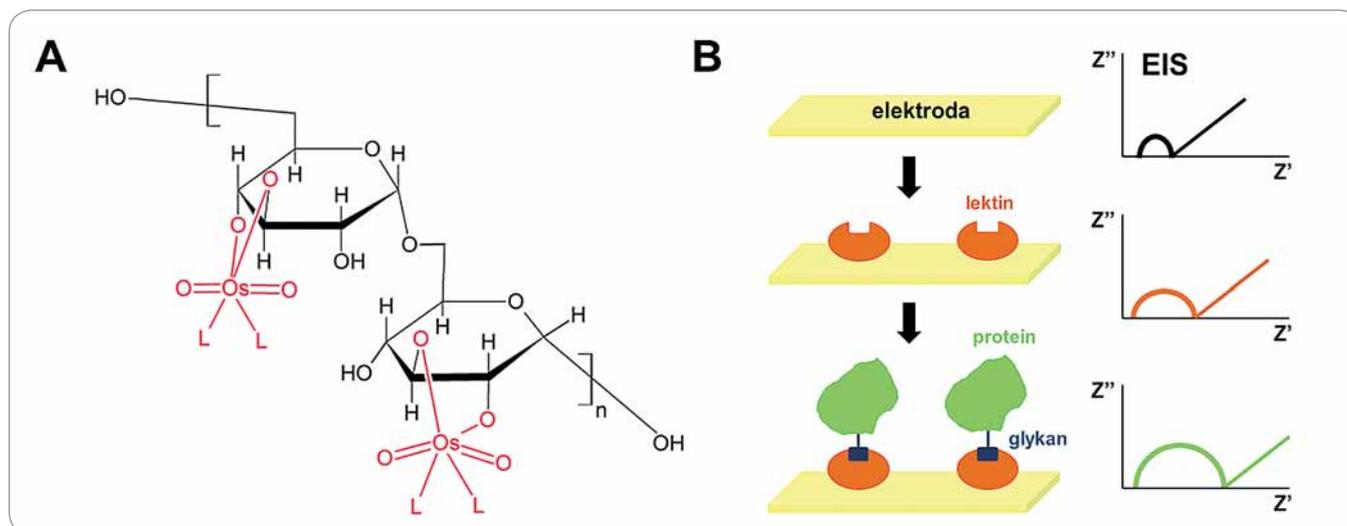
Existují práce, i když zatím jich je mnohem méně, ve kterých se namísto imobilizace protilátek využívají tzv. aptamery [58–61]. Jedná se o syntetické jednořetězové DNA nebo RNA sekvence vázající se s vysokou afinitou (porovnatelnou s protilátkami) k různým biomolekulám (proteinům, peptidům, ale i menším organickým molekulám; obr. 2D). Jejich nespornou výhodou v porovnání s protilátkami je rychlejší

i levnější příprava a též jejich menší molekulová hmotnost, jež umožňuje dosáhnout mnohem vyšší povrchové koncentrace aptamerů při imobilizaci na povrch tzv. aptasenzorů. Protože se však jedná o nukleové kyseliny, jsou méně stabilní v biologickém prostředí vzhledem k přítomnosti nukleáz.

Elektrochemie bílkovin by mohla být užitečná i v onkologickém výzkumu, např. při detekci proteinových biomarkerů [62–65]. Pozornost se zejména soustředí na vývoj sofistikovaných čipů obsahujících vedle sebe více elektrod, čímž by byla umožněna paralelní detekce různých biomarkerů konkrétního nádorového onemocnění (jeden druh biomarkeru totiž často nestačí). Tyto čipy by měly být spolehlivé a zároveň levné, dostatečně citlivé a selektivní pouze k daným biomarkerům a jejich obsluha by měla být co nejjednodušší. Úkol to zajisté není snadný, postupně se však

objevují práce ukazující, kterým směrem postupovat pro dosažení tohoto cíle, jako např. mikrofluidický imunosenzor pro simultánní detekci čtyř biomarkerů – interleukinu 6, interleukinu 8, vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a VEGF-C – získaných přímo ze sér pacientů s karcinomem dutiny ústní [66]. Na vzorku 78 pacientů a 49 negativních kontrol autoři detekovali za necelou hodinu velmi nízké koncentrace biomarkerů (řádově fg/ml), přičemž výsledky dobře korelovaly s výsledky ELISA.

Kromě detekce biomarkerů byla elektrochemie aplikována i pro studium vlivu onkogenních mutací na DNA-vazebnou doménu u nádorového supresoru p53, a to pomocí již zmíněného elektrokatalytického píku H [46]. Výsledky pro wild type i mutantní p53 výborně korelovaly s údaji o struktuře a stabilitě a poskytly hlubší pohled do rozdílného dyna-



Obr. 3. Elektrochemická analýza cukerné složky pro detekci glykoproteinů.

A. Modifikace oligosacharidů a polysacharidů pomocí komplexů šestimocného osmia a dusíkatého ligandu, Os(VI)L. B. Konstrukce lektinového biosenzoru pro detekci glykoproteinů pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS). Velikost půlkruhu je úměrná odporu přenosu elektronů (a naopak nepřímo úměrná propustnosti vrstvy), a tudíž zvýšení odporu signalizuje přítomnost cílové bílkoviny.

mického chování jednotlivých mutantů. Kromě toho pik H umožnil monitorování ztráty nezbytného zinečnatého iontu způsobenou mutací (R175H) nebo chelátovou vazbou s EDTA. Obecně by tato metoda mohla být aplikována pro analýzu prakticky jakékoliv bílkoviny i jako senzor pro konformační přeměny nebo vazbu ligandů, zejména jako doplněk konvenčních technik.

Polysacharidy

V přírodě polysacharidy (PS) a oligosacharidy (OLS) vytvářejí velké a dosti odlišné třídy látek vyskytující se volně nebo vázané na proteiny či lipidy [67]. Díky jejich strukturní flexibilitě, která jim umožňuje nepřeborné množství kombinací vzájemného propojení, jsou bezpochyby ideálními „identifikátory“ v mezimolekulové a mezibuněčné komunikaci [68]. V poslední době se ukazuje, že většina bílkovin se v buňkách savců vyskytuje právě ve formě glykoproteinů. Glykosylace bílkovin často hraje důležitou roli ve zdraví i nemoci člověka, a to včetně rakoviny, u níž bývá např. pozorována abnormální glykosylace bílkovin na povrchu nádorových buněk.

Není proto divu, že v současné době lze pozorovat zvýšený zájem o nové metody analýzy PS, OLS a glykoproteinů. PS neobsahují redoxní skupiny, a byly

proto do nedávna považovány za elektrochemicky inaktivní látky. Teprve v roce 2009 bylo zjištěno, že některé sulfátované PS katalyzují vylučování vodíku a poskytují CPS signály na rtuťových elektrodách [69]. Zcela nedávno vyšlo najevo, že daleko intenzivnější signály tohoto typu poskytují některé PS a OLS obsahující glukosamin [70]. Vedle toho se ukázalo, že PS a OLS lze snadno modifikovat komplexy šestimocného osmia s dusíkatými ligandy (Os(VI)L) [71,72], přičemž vzniklé adukty (obr. 3A) jsou elektrochemicky aktivní (podobně jako výše zmíněné značení miRNA). Použití některých ligandů (např. bipyridinu) umožňuje i vznik aduktů, které mohou navíc poskytnout citlivější signály podmíněné katalytickým vylučováním vodíku [71]. U jiných ligandů (temed) je zase možné stanovení PS a OLS přímo v reakční směsi. Proti některým aduktům PS-Os(VI)L byly generovány vysoce specifické monoklonální protilátky, které je možno použít k analýze Os(VI)L-modifikovaných glykanů přímo v glykoproteinech.

K dynamicky rozvíjející se oblasti patří i tzv. lektinové biosenzory pro detekci glykanů (tj. cukerných zbytků u glykoproteinů či glykolipidů) využívající elektrochemickou impedanční spektroskopii (EIS) [64,68]. Lektiny, což jsou proteiny

selektivně vázající různé mono- nebo oligosacharidy, jsou nejdříve imobilizovány na povrchu senzoru (obvykle zlaté elektrody) a po přidání vzorku dochází přes glykan k vazbě hledaného glykoproteinu a imobilizovaného lektinu (obr. 3B). Pomocí EIS se pak sleduje změna odporu elektronového přenosu na rozhraní elektroda/elektrolyt (jinak řečeno změna propustnosti elektrodové vrstvy), přičemž vazba glykoproteinu na lektin (vytvoření komplexu) vede ke snížení propustnosti této vrstvy. Lektinové biosenzory již byly použity pro detekci bílkovin p53 [73], mucinu [74], VEGF [75], nebo karcinoembryonálního antigenu [76], ale i celých nádorových buněk [77,78]. Nesporně skýtají obrovský potenciál pro jednoduchou a rychlou detekci nádorových biomarkerů i jiných bílkovin důležitých v biomedicíně.

Závěr a výhled do budoucnosti

I když v posledních letech nepochybně došlo k výraznému pokroku elektrochemické analýzy biomakromolekul, stále ještě čelíme řadě výzev i překážek. Jednou z nich je aplikovatelnost metody pro analýzu reálných vzorků od pacientů, které bývají mnohem komplexnější než modelové systémy, na nichž jsou jednotlivé strategie vybudovány. Je nesmírně důležité, aby současné stu-

die čím dál více pracovaly i s tak složitým prostředím, jako jsou lidské tělní tektutiny, kde citlivost a selektivita metody budou hrát klíčovou roli. V těchto prostředích je navíc potřebné dostatečně minimalizovat nespecifické adsorpce nežádoucích molekul, aby nedocházelo k falešně pozitivním výsledkům. Elektrodové povrchy se někdy nesnadno obnovují do původního stavu, takže následná měření mohou být zkreslená. Zde by se mohly uplatnit velmi oblíbené levné tištěné elektrody pro jedno použití nevyžadující regeneraci. Aplikace nanotechnologií výrazně napomáhají ke zvýšení citlivosti senzorů. Dovolíme si konstatovat, že díky obrovskému úsilí vědeckých týmů po celém světě se postupně otevírají cesty pro využití elektrochemické analýzy v současné genomice, proteomice i glykomicce.

Literatura

1. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids – a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171(4356): 737–738.
2. Berg H. Polarographische Untersuchungen an Nucleinsäuren und Nucleasen. I. Mitt. Polarographische Nachweis von Proteinen neben Nucleinsäuren. *Biochem Z* 1957; 329(3): 274–276.
3. Paleček E. Oscillographische Polarographie der Nucleinsäuren und ihrer Bestandteile. *Naturwiss* 1958; 45(8): 186–187.
4. Paleček E. Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid. *Nature* 1960; 188: 656–657.
5. Paleček E. Polarographic behaviour of native and denatured deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol* 1966; 20(2): 263–281.
6. Paleček E. The polarographic behaviour of double-helical DNA containing single-strand breaks. *Biochim Biophys Acta* 1967; 145(2): 410–417.
7. Hillson PJ. Interactions between dye ions and substances of high molecular weight – a polarographic investigation. *J Soc Dyers Colour* 1967; 83(5): 186.
8. Brabec V, Dryhurst G. Electrochemical oxidation of polyadenylic acid at graphite electrodes. *J Electroanal Chem* 1978; 91(2): 219–229.
9. Lukasova E, Jelen F, Paleček E. Electrochemistry of osmium nucleic-acid complexes – a probe for single-stranded and distorted double-stranded regions in DNA. *Gen Physiol Biophys* 1982; 1(1): 53–70.
10. Paleček E, Postbieglova I. Adsorptive stripping voltammetry of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer. *J Electroanal Chem* 1986; 214(1): 359–371.
11. Paleček E, Bartosik M. Electrochemistry of nucleic acids. *Chem Rev* 2012; 112(6): 3427–3481.
12. Lee AC, Dai ZY, Chen BW et al. Electrochemical branched-DNA assay for polymerase chain reaction-free detection and quantification of oncogenes in messenger RNA. *Anal Chem* 2008; 80(24): 9402–9410. doi: 10.1021/ac801263r.
13. Horakova P, Simkova E, Vychodilova Z et al. Detection of single nucleotide polymorphisms in p53 mutation hotspots and expression of mutant p53 in human cell lines using an enzyme-linked electrochemical assay. *Electroanalysis* 2009; 21(15): 1723–1729.
14. Hou P, Ji M, Ge C et al. Detection of methylation of human p16(Ink4a) gene 5'-CpG islands by electrochemical method coupled with linker-PCR. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(16): e92.
15. Ertl P, Emrich CA, Singhal P et al. Capillary electrophoresis chips with a sheath-flow supported electrochemical detection system. *Anal Chem* 2004; 76(13): 3749–3755.
16. Yang IV, Thorp HH. Modification of indium tin oxide electrodes with repeat polynucleotides: electrochemical detection of trinucleotide repeat expansion. *Anal Chem* 2001; 73(21): 5316–5322.
17. Fojta M, Havran L, Vojtiskova M et al. Electrochemical detection of DNA triplet repeat expansion. *J Am Chem Soc* 2004; 126(21): 6532–6533.
18. Ariksoylal DO, Karadeniz H, Erdem A et al. Label-free electrochemical hybridization genosensor for the detection of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance. *Anal Chem* 2005; 77(15): 4908–4917.
19. Farabullini F, Lucarelli F, Palchetti I et al. Disposable electrochemical genosensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants. *Biosens Bioelectron* 2007; 22(7): 1544–1549.
20. Campuzano S, Kuralay F, Lobo-Castanon MJ et al. Ternary monolayers as DNA recognition interfaces for direct and sensitive electrochemical detection in untreated clinical samples. *Biosens Bioelectron* 2011; 26(8): 3577–3583. doi: 10.1016/j.bios.2011.02.004.
21. Carpinì G, Lucarelli F, Marrazza G et al. Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. *Biosens Bioelectron* 2004; 20(2): 167–175.
22. Fojta M. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis* 2002; 14(21): 1449–1463.
23. Brabec V. DNA sensor for the determination of antitumor platinum compounds. *Electrochim Acta* 2000; 45(18): 2929–2932.
24. Horakova P, Tesnohlikova L, Havran L et al. Determination of the level of DNA modification with cisplatin by catalytic hydrogen evolution at mercury-based electrodes. *Anal Chem* 2010; 82(7): 2969–2976. doi: 10.1021/ac902987x.
25. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008; 9(6): 465–476. doi: 10.1038/nrg2341.
26. Sato S, Tsueda M, Kanazaki Y et al. Detection of an aberrant methylation of CDH4 gene in PCR product by ferrocenyl naphthalene diimide-based electrochemical hybridization assay. *Anal Chim Acta* 2012; 715: 42–48. doi: 10.1016/j.aca.2011.12.010.
27. Ioannou A, Alexiadou D, Kouidou S et al. Use of adsorptive transfer stripping voltammetry for analyzing variations of cytosine methylation in DNA. *Electroanalysis* 2009; 21(24): 2685–2692.
28. Kato D, Sekioka N, Ueda A et al. A nanocarbon film electrode as a platform for exploring DNA methylation. *J Am Chem Soc* 2008; 130(12): 3716–3717. doi: 10.1021/ja710536p.
29. Bartosik M, Fojta M, Paleček E. Electrochemical detection of 5-methylcytosine in bisulfite-treated DNA. *Electrochim Acta* 2012; 78: 75–81.
30. Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 2012; 33(6): 1126–1133. doi: 10.1093/carcin/bgs140.
31. Wei F, Wang J, Liao W et al. Electrochemical detection of low-copy number salivary RNA based on specific signal amplification with a hairpin probe. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(11): e65. doi: 10.1093/nar/gkn299.
32. Hamidi-Asl E, Palchetti I, Hasheminejad E et al. A review on the electrochemical biosensors for determination of microRNAs. *Talanta* 2013; 115: 74–83. doi: 10.1016/j.talanta.2013.03.061.
33. Klíč T, Topkaya SN, Ariksoylal DO et al. Electrochemical based detection of microRNA, mir21 in breast cancer cells. *Biosens Bioelectron* 2012; 38(1): 195–201. doi: 10.1016/j.bios.2012.05.031.
34. Wang ZW, Zhang J, Guo Y et al. A novel electrically magnetic-controllable electrochemical biosensor for the ultra sensitive and specific detection of attomolar level oral cancer-related microRNA. *Biosens Bioelectron* 2013; 45: 108–113. doi: 10.1016/j.bios.2013.02.007.
35. Bettazzi F, Hamid-Asl E, Esposito CL et al. Electrochemical detection of miRNA-222 by use of a magnetic bead-based bioassay. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(2–3): 1025–1034. doi: 10.1007/s00216-012-6476-7.
36. Wang J, Yi X, Tang H et al. Direct quantification of microRNA at low picomolar level in sera of glioma patients using a competitive hybridization followed by amplified voltammetric detection. *Anal Chem* 2012; 84(15): 6400–6406. doi: 10.1021/ac203368h.
37. Trefulka M, Bartosik M, Paleček E. Facile end-labeling of RNA with electroactive Os(VI) complexes. *Electrochem Commun* 2010; 12: 1760–1763.
38. Bartosik M, Trefulka M, Hrstka R et al. Os(VI)bipy-based electrochemical assay for detection of specific microRNAs as potential cancer biomarkers. *Electrochem Commun* 2013; 33: 55–58.
39. Herles F, Vancura A. A research on the cause of a characteristic “wave” on the polarographic curve of human serum. *Bull Int Acad Sci Boheme* 1932; 33: 119–120.
40. Heyrovsky J, Babicka J. Polarographic studies with the dropping mercury cathode. Part XIII. The effect of albumins. *Collect Czech Chem Commun* 1930; 2: 370.
41. Paleček E, Heyrovsky M, Janik B et al. From DC polarographic presodium wave of proteins to electrochemistry of biomacromolecules. *Collect Czech Chem Commun* 2009; 74(11–12): 1739–1755.
42. Kizek R, Vacek J, Trnkova L et al. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins. *Chem Listy* 2004; 98(4): 166–173.
43. Ostatna V, Kuralay F, Trnkova L et al. Constant current chronopotentiometry and voltammetry of native and denatured serum albumin at mercury and carbon electrodes. *Electroanalysis* 2008; 20(13): 1406–1413.
44. Paleček E, Ostatna V, Masarik M et al. Changes in interfacial properties of alpha-synuclein preceding its aggregation. *Analyst* 2008; 133(1): 76–84.
45. Bartosik M, Ostatna V, Paleček E. Electrochemistry of riboflavin-binding protein and its interaction with riboflavin. *Bioelectrochemistry* 2009; 76(1–2): 70–75. doi: 10.1016/j.bioelechem.2009.04.006.
46. Paleček E, Ostatna V, Cernocka H et al. Electrochemical monitoring of metal binding and mutation-induced conformational changes in p53 at picomole level. *J Am Chem Soc* 2011; 133(18): 7190–7196. doi: 10.1021/ja201006s.
47. Dorcak V, Paleček E. Electrochemical determination of thioredoxin redox states. *Anal Chem* 2009; 81(4): 1543–1548. doi: 10.1021/ac802274p.
48. Kerman K, Morita Y, Takamura Y et al. Escherichia coli single-strand binding protein-DNA interactions on carbon nanotube-modified electrodes from a label-free electrochemical hybridization sensor. *Anal Bioanal Chem* 2005; 381(6): 1114–1121.
49. Kerman K, Vestergaard M, Chikae M et al. Label-free electrochemical detection of the phosphorylated and non-phosphorylated forms of peptides based on tyrosine oxidation. *Electrochem Commun* 2007; 9(5): 976–980.
50. Zatloukalova M, Orolinova E, Kubala M et al. Electrochemical determination of transmembrane protein Na⁺/K⁺-ATPase and Its cytoplasmic loop C45. *Electroanalysis* 2012; 24(8): 1758–1765.
51. Wang J, Rivas G, Cai XH et al. Trace measurements of insulin by potentiometric stripping analysis at carbon paste electrodes. *Electroanalysis* 1996; 8(10): 902–906.
52. Masarik M, Stobiecka A, Kizek R et al. Sensitive electrochemical detection of native and aggregated alpha-synuclein

- protein involved in Parkinson's disease. *Electroanalysis* 2004; 16(13–14): 1172–1181.
53. Pei XM, Zhang B, Tang J et al. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Anal Chim Acta* 2013; 758: 1–18. doi: 10.1016/j.aca.2012.10.060.
54. Wan Y, Su Y, Zhu XH et al. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosens Bioelectron* 2013; 47: 1–11. doi: 10.1016/j.bios.2013.02.045.
55. Liu GD, Lin YH. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. *Talanta* 2007; 74(3): 308–317. doi: 10.1016/j.talanta.2007.10.014.
56. Dijkstra M, Kamp B, Hoogvliet JC et al. Development of an electrochemical immunosensor for direct detection of interferon- γ at the attomolar level. *Anal Chem* 2001; 73(5): 901–907.
57. Munge BS, Coffey AL, Doucette JM et al. Nanostructured immunosensor for attomolar detection of cancer biomarker interleukin-8 using massively labeled superparamagnetic particles. *Angew Chem Int Ed* 2011; 50(34): 7915–7918. doi: 10.1002/anie.201102941.
58. Hong P, Li WL, Li JM. Applications of aptasensors in clinical diagnostics. *Sensors* 2012; 12(2): 1181–1193. doi: 10.3390/s120201181.
59. Mascini M, Palchetti I, Tombelli S. Nucleic acid and peptide aptamers: fundamentals and bioanalytical aspects. *Angew Chem Int Ed* 2012; 51(6): 1316–1332. doi: 10.1002/anie.201006630.
60. Xu Y, Cheng GF, He PG et al. A review: electrochemical aptasensors with various detection strategies. *Electroanalysis* 2009; 21(11): 1251–1259.
61. Hianik T, Wang J. Electrochemical aptasensors – recent achievements and perspectives. *Electroanalysis* 2009; 21(11): 1223–1235.
62. Rusling JF, Kumar CV, Gutkind JS et al. Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *Analyst* 2010; 135(10): 2496–2511. doi: 10.1039/c0an00204f.
63. Chikkaveeraiiah BV, Bhirde AA, Morgan NY et al. Electrochemical immunosensors for detection of cancer protein biomarkers. *ACS Nano* 2012; 6(8): 6546–6561. doi: 10.1021/nn3023969.
64. Luo X, Davis JJ. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chem Soc Rev* 2013; 42(13): 5944–5962. doi: 10.1039/c3cs60077g.
65. Rusling JF. Multiplexed electrochemical protein detection and translation to personalized cancer diagnostics. *Anal Chem* 2013; 85(11): 5304–5310. doi: 10.1021/ac401058v.
66. Malhotra R, Patel V, Chikkaveeraiiah BV et al. Ultrasensitive detection of cancer biomarkers in the clinic by use of a nanostructured microfluidic array. *Anal Chem* 2012; 84(14): 6249–6255. doi: 10.1021/ac301392g.
67. Jelinek R, Kolusheva S. Carbohydrate biosensors. *Chem Rev* 2004; 104(12): 5987–6015.
68. Bertok T, Katrlík J, Gemeiner P et al. Electrochemical lectin based biosensors as a label-free tool in glycomics. *Microchim Acta* 2013; 180(1–2): 1–13.
69. Strmecki S, Plavsic M, Cosovic B et al. Constant current chronopotentiometric stripping of sulphated polysaccharides. *Electrochem Commun* 2009; 11: 2032–2035.
70. Palecek E, Rimankova L. Chitosan catalyzes hydrogen evolution at mercury electrodes. *Electrochem Commun* 2014. In press.
71. Palecek E, Trefulka M. Electrocatalytic detection of polysaccharides at picomolar concentrations. *Analyst* 2011; 136(2): 321–326. doi: 10.1039/c0an00681e.
72. Trefulka M, Palecek E. Voltammetry of Os(VI)-modified polysaccharides at carbon electrodes. *Electroanalysis* 2009; 21(15): 1763–1766.
73. Yeo J, Park JY, Bae WJ et al. Label-free electrochemical detection of the p53 core domain protein on its antibody immobilized electrode. *Anal Chem* 2009; 81(12): 4770–4777. doi: 10.1021/ac900301h.
74. Zheng GF, Patolsky F, Cui Y et al. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat Biotechnol* 2005; 23(10): 1294–1301.
75. Sezginurk MK, Uygun ZO. An impedimetric vascular endothelial growth factor biosensor-based PAMAM/cysteamine-modified gold electrode for monitoring of tumor growth. *Anal Biochem* 2012; 423(2): 277–285. doi: 10.1016/j.ab.2011.12.049.
76. Hou L, Cui Y, Xu M et al. Graphene oxide-labeled sandwich-type impedimetric immunoassay with sensitive enhancement based on enzymatic 4-chloro-1-naphthol oxidation. *Biosens Bioelectron* 2013; 47: 149–156. doi: 10.1016/j.bios.2013.02.035.
77. Ertl P, Wagner M, Corton E et al. Rapid identification of viable *Escherichia coli* subspecies with an electrochemical screen-printed biosensor array. *Biosens Bioelectron* 2003; 18(7): 907–916.
78. Ding L, Ji Q, Qian R et al. Lectin-based nanoprobe functionalized with enzyme for highly sensitive electrochemical monitoring of dynamic carbohydrate expression on living cells. *Anal Chem* 2010; 82(4): 1292–1298. doi: 10.1021/ac902285q.

Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi

Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice

Koubková L.¹, Vojtěšek B.¹, Vyzula R.^{1,2}

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Metoda masivně paralelního sekvenování umožnila rychlejší a ekonomičtější výzkum v oblasti genomiky. Tato technologie umožňuje osekvenovat kompletní lidský genom za zlomek ceny i času v porovnání s doposud používanou Sangerovou metodou. Zavedení této techniky do oblasti onkologického výzkumu významně přispělo k molekulární charakterizaci nádorů a hlubšímu porozumění jejich evoluce. Pomocí masivně paralelního sekvenování byly identifikovány nové kauzální mutace, které jsou podstatou nádorových dědičných syndromů, porovnáním sekvenování DNA nádorové a příslušné zdravé tkáně byly odhaleny nové mutace a strukturní aberace u více než 15 rozdílných nádorových onemocnění. V tomto přehledu jsou uvedeny technické charakteristiky nejrozšířenějších sekvenačních platform, krátce shrnuty jejich výhody a nevýhody a popsány možnosti uplatnění v klinické praxi.

Klíčová slova

technologie masivně paralelního sekvenování – genomika – mutace – onkologický výzkum – klinická aplikace – personalizovaná léčba

Summary

Development of new sequencing methods allowed faster and more economical genomic research. With these technologies, it is now possible to determine the complete sequence of human genome in a short time period and at a relatively low cost. Introduction of next generation sequencing methods to cancer research provided a comprehensive molecular characterization of cancers and enabled deeper insights into tumor complexity, heterogeneity and evolution. Next generation technologies have been applied to identify new causal mutations in genes in hereditary cancer syndromes. More than 15 various tumor types have been already sequenced and compared to that of normal cells allowing identification of new cancer driving mutations and genome structural rearrangements. In this review, we describe technical characteristics of main next generation sequencing platforms, briefly overview their pros and cons and clinical perspective.

Key words

high-throughput nucleotide sequencing – genomics – mutations – cancer research – clinical application – personalized treatment

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Lucie Koubková

Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: lucie.koubkova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 2. 2014

Přijato/Accepted: 1. 4. 2014

Úvod

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) jako genetický materiál byla popsána v roce 1944 Oswaldem Theodorem Averym [1]. Několik let poté (1953) objevili Watson a Crick [2] dvouvláknovou strukturu DNA a její čtyři základní stavební kameny. Genetická informace téměř každého druhu je uložena v primární struktuře nukleových kyselin a znalost její sekvence je zásadní informací pro výzkum buněčných struktur a jejich funkcí, s jejichž pomocí se moderní věda snaží odhalit „tajemství života“. Rozluštění DNA sekvence je nezbytné v podstatě pro všechna odvětví biologického výzkumu. Ještě na začátku 70. let 20. století bylo sekvenování DNA velmi obtížné a provádělo se nepřímo sekvenováním RNA molekul. Druhá polovina 80. let přinesla hned dvě metody DNA sekvenování. První metoda, kterou vynalezli Maxam a Gilbert [3], je založena na chemické modifikaci DNA a následném rozštěpení řetězce v místech modifikovaných nukleotidů. Druhá byla publikována Frederikem Sangerem et al v roce 1977 [4]. Je známa jako enzymatická metoda sekvenování (Sangerovo sekvenování) a využívá specifických vlastností DNA polymerázy při syntéze nového řetězce. Technologie enzymového sekvenování byla „první generací“ komerčně dostupného sekvenování a navzdory její pracnosti i časové náročnosti se Sangerovo sekvenování stalo velmi rozšířeným v laboratořích po celém světě. Významný pokrok přinesla automatizace této technologie. V roce 1987 uvedla firma Applied Biosystems na trh první automatický sekvenátor (AB370) využívající kapilární elektroforézu k separaci jednotlivých úseků DNA a umožňující osekvenovat 500 kilobází za den s délkou čteného fragmentu (tzv. read) okolo 600 bází. Současný model AB3730xl dokáže za den vyhodnotit až 2,88 megabází a délka čtení dosahuje 900 bází [5]. Automatické sekvenátory dominovaly v oblasti molekulární biologie téměř dvě desetiletí a vedly k významným objevům [6]. Za vynaložení velkého úsilí a peněz byl pomocí těchto sekvenátorů přečten první lidský genom. Projekt lidského genomu (human genome project) nicméně poukázal na limitace San-

gerova sekvenování a potřebu nových technologií s vyšší výkonností a přesností, nižšími náklady a menší pracností.

Sekvenátory nové generace

Technika sekvenování DNA zaznamenala během posledních let velký posun kupředu díky novým sekvenátorům tzv. druhé generace. Sekvenátory první generace detekovaly DNA báze v řadě jednu po druhé, zatímco sekvenátory druhé generace umožňují masivní paralelní sekvenování až tisíců molekul DNA současně. Díky technologii masivního paralelního sekvenování se významně snížila doba potřebná k přečtení dlouhých DNA sekvencí. K určení sekvence prvního lidského genomu bylo potřeba 10 let. Nové technologie sekvenování umožňují určit sekvenci lidského genomu nebo jen jeho vybraných částí za zlomek času (několik týdnů) a za mnohem nižší cenu. Sangerovo sekvenování se v současnosti stále využívá a hodí se např. pro sekvenování PCR produktů nebo pro malé sekvenační projekty, ale pro náročnější aplikace je nahrazováno sekvenátory druhé generace. Trhu dnes dominují tři platformy: Roche 454 Genome Sequencer, Illumina Genome Analyzer a Life Technologies SOLiD System. Všechny tři platformy byly vyvinuty na konci 90. let 20. století a na trh uvedeny kolem roku 2005 [7]. Ačkoli všechny dostupné technologie sekvenování druhé generace (next generation sequencing – NGS) využívají rozdílnou chemii, sdílejí společně tyto kroky: a) příprava templátu neboli vytvoření knihovny ampikonů, b) sekvenování a detekce inkorporovaných nukleotidů a c) analýza dat. Unikátní kombinace přístupů k jednotlivým krokům celého sekvenačního běhu určuje rozdíly mezi jednotlivými technologiemi a typem a množstvím produkovaných dat. Rozdíly ve výstupních datech představují výzvu v interpretaci výsledků dosažených různými platformami při porovnávání stejné sekvence. Všichni výrobci poskytují odhad přesnosti a kvality jednotlivých čtení, ale neexistuje žádný konsenzus, že kvalita čtení z jedné platformy je ekvivalentní kvalitě čtení z platformy druhé [6]. NGS technologie mohou být rozděleny do dvou základních kategorií. První sku-

pinu představují technologie založené na PCR amplifikaci templátu (PCR-based technologies) a zahrnují tyto komerčně dostupné platformy: Roche 454 System, Illumina sequencers, AB SOLiD System and Ion Personal Genome Machine. Druhou skupinu tvoří technologie, které využívají tzv. single-molecule sequencing, tzn. že nedochází k amplifikačnímu kroku před vlastní sekvenací. Tato skupina zahrnuje např. technologie HelixScope a PacBio RS SMRT Ssystem [8] a Oxford Nanopore.

Roche 454

První komerčně dostupný NGS analyzátor 454 Genome FLX System byl uveden na trh v roce 2005. Pracuje na principu tzv. pyrosekvenování. To lze zjednodušeně popsat jako sled enzymatických reakcí, během kterých se začleňují jednotlivé báze do nově vznikajícího řetězce DNA, přičemž dochází k emisi viditelného světla. Množství uvolněného světla je úměrné počtu začleněných nukleotidů. Celý proces začíná přípravou DNA knihovny, kdy je DNA naštěpena na dvouvláknové fragmenty a k jednotlivým fragmentům jsou připojeny krátké koncově specifické adaptory (A a B) sloužící v dalších krocích k purifikaci a amplifikaci i k vlastní sekvenaci. B-adaptor je na svém 5'-konci označen biotinem, který slouží k imobilizaci fragmentů na streptavidinem pokryté magnetické kuličky. Dvouvláknové fragmenty navázané na magnetické kuličky jsou denaturovány, přičemž nebiotinylovaný komplementární řetězec je uvolněn [7]. Takto vzniklé jednořetězcové fragmenty (knihovna DNA) jsou připraveny k hybridizaci ke speciálním DNA kuličkám, které mají na svém povrchu komplementární sekvenci DNA sloužící jako primer pro následnou amplifikaci. Technologie 454 využívá klonální amplifikaci pomocí emulzní PCR (emPCR). Hybridizační podmínky jsou navrženy tak, aby se na jednu DNA kuličku navázal pouze jeden DNA fragment. Každá kulička je uzavřena ve svém vlastním „mikroreaktoru“ – olejové emulzi s vodou, kde probíhá nezávislá amplifikace jednoho fragmentu. Po skončení emPCR jsou kuličky uvolněny z emulze, přičemž každá nese v průměru 10 milionů identických kopií původní

DNA. Následuje tzv. enrichment (obohacení) – krok, kdy se zachovávají pouze kuličky s amplifikovanou DNA, a zbytek se odmyje. Na obohacené kuličky, které nyní nesou jednořetězcové DNA fragmenty, se přichytí sekvenační primer a celá směs se nanese do jamky tzv. pikotitrační destičky (pico titer plate – PTP), která je navržena tak, aby do jedné jamky zapadla pouze jedna DNA kulička. PTP je rozdělena do čtyř vrstev, kam se centrifugací postupně vpraví další druhy kuliček důležité pro pyrosekvenační reakci. Klíčové komponenty reakce představují kuličky s enzymy sulfurylázou, luciferázou, apyrázou a DNA polymerázou a se substráty adenosin 5'-fosfosulfátem (APS) a luciferinem. Jednotlivé nukleotidy proudí nad PTP v pevném pořadí. Inkorporace komplementárního nukleotidu DNA polymerázou do nově vznikajícího řetězce je doprovázena uvolněním pyrofosfátu, který je pomocí enzymu ATP sulfurylázy za přítomnosti APS přiveden na ATP, jež umožní konverzi luciferinu na oxyluciferin katalyzované enzymem luciferázou. Při této reakci dochází k emisi viditelného světla, které je zaznamenáno CCD čipem. Nespotřebované nukleotidy a ATP jsou degradovány apyrázou. Proces se cyklicky opakuje a sekvence je odečítána z tzv. pyrogramu. Hrubá data jsou procesována 454 pyrosekvenačním softwarem a analyzována různými filtry kvality pro odstranění sekvencí nízké kvality nebo sekvencí, které mají více jak jeden iniciální DNA fragment. Pro analýzu dat jsou dostupné tyto bioinformatické nástroje: GS De Novo Assembler, GS Reference Mapper a GS Amplicon Variant Analyzer [7]. Současný sekvenátor GS FLX Titanium chemistry poskytuje v jednom běhu až jeden milion čtení dlouhých až 1 000 bází [9]. Na trhu je dostupný také stolní (tzv. benchtop) sekvenátor GS Junior s nižší kapacitou vhodný do rutinních laboratoří [8]. Jako všechny platformy má i technologie 454 své výhody a nevýhody. Její největší limitací jsou problémy v detekci homopolymerních úseků, jako např. AAA a GGG. V procesu inkorporace více nukleotidů stejného typu závisí počet začleněných nukleotidů pouze na množství emitovaného světla. Tato technologie je tedy náchylná k větším chybám v určení

počtu začleněných nukleotidů a z toho plynoucí inserce nebo delece v homopolymerních úsecích spíše než substituce nukleotidu [9]. Tento problém byl částečně vyřešen pomocí speciálních programů, které dokážou rozlišit a vyfiltrovat chybové sekvence [10]. Další nevýhoda je stále vysoká cena reagentů. Ve srovnání s ostatními platformami však 454 technologie poskytuje velmi dlouhá čtení, a výborně se tak hodí pro celogenomové *de novo* sekvenování, resekvenování (sekvence části nebo celého genomu se porovnává s již známou sekvencí za účelem nalézt rozdíly oproti referenční sekvenci) a pro studium bakteriální diverzity, kdy se analyzují mikrobiální genomy z různých vzorků (metagenomika) [9]. Jinou nespornou výhodou 454 technologie je její vysoká rychlost – pouhých 10 hod pro kompletní celého sekvenačního procesu [5].

Illumina/Solexa

První sekvenátor založený na principu sekvenace syntézou ve spojení s tzv. bridge amplifikací uvedla na trh společnost Illumina v roce 2007 [8]. U této technologie se templátová DNA hybridizuje na opticky transparentní pevný povrch reakční komůrky (flow cell) a využívá chemicky reverzibilně modifikovaných nukleotidů [9]. Příprava knihovny zahrnuje naštěpení DNA na fragmenty o velikosti < 800 bází. Konce fragmentů jsou zarovnané, fosforylovány a na 3'-konci adenylovány a k oběma koncům jsou přidány adaptory. Po denuraci jsou jednotlivé fragmenty hybridizovány k reakční komůrce, jejíž povrch je hustě pokryt komplementárními adaptory k adaptorům připojeným k DNA fragmentům. Každý fragment je tak svým jedním koncem imobilizován k povrchu reakční komůrky, kde následně probíhá amplifikace. Poté je přidána směs reagentů potřebných pro PCR, adaptory na povrchu reakční komůrky slouží jako primery pro syntézu dvouvláknové DNA. Ta je následně denaturována. Původní templát je odmyt a nově syntetizované vlákno DNA zůstává kovalentně navázáno k povrchu reakční komůrky. Svým volným koncem hybridizuje k adaptorům (primerům) na povrchu reakční komůrky, vlákno se ohne a dojde k pře-

mostění. V dalším PCR cyklu je adaptor (primer) opět prodloužen polymerázou a vytvoří se dvouvláknový most (bridge). Celý proces se cyklicky opakuje, je proto nazýván bridge amplification. Nakonec jsou dvouvláknové mosty denaturovány, reverzní řetězce odštěpeny a odmyty a zůstanou pouze tzv. klastry tvořené cca 1 000 identických kopií DNA fragmentů připravených k vlastní sekvenaci. Sekvenační primery jsou hybridizovány k adaptorovým sekvencím a do reakční komůrky s klastry je nalita směs polymerázy a čtyř rozdílně fluorescenčně značených nukleotidů s chemicky inaktivovanou 3'-OH skupinou. Je tak zaručeno, že v jednom cyklu je inkorporován pouze jeden nukleotid. Jakmile dojde k začlenění nukleotidu do řetězce DNA, pozice a typ nukleotidu jsou zaznamenány díky jeho fluorescenční značce pomocí CCD kamery. Terminační skupina na 3'-konci nukleotidu i fluorescenční barvička jsou odstraněny a cyklus je opakován. Sekvence každého klastru je generována speciálním algoritmem, který jednotlivým bázím přiděluje určitou hodnotu, na jejímž základě jsou vyřazeny sekvence nízké kvality. První sekvenátor společnosti Illumina, Illumina Genome Analyzer poskytoval přečtení sekvencí dlouhých 35 bází a generoval 1 gigabázi (Gb) dat za jeden sekvenační běh, který trval 2–3 dny. V současnosti je v nabídce společnosti Illumina několik přístrojů různé výkonnosti: (throughput) MiSeq, MiSeqDx, NextGen 500, HiSeq2500 a HiSeq X Ten. MiSeq a MiSeqDx jsou sekvenátory určené do malých laboratoří pro sekvenování malých genomů, ampliconové sekvenování a cílené sekvenování vybraných oblastí genů. MiSeqDx je prvním sekvenátorem schváleným americkou FDA (Food and Drug Administration) pro *in vitro* molekulární diagnostiku garantující spolehlivost výsledků. NextGen 500 představuje první vysokokapacitní stolní sekvenátor umožňující nejširší záběr DNA i RNA sekvenačních aplikací. HiSeq2500 je ultra vysokokapacitní sekvenátor umožňující opět nejširší záběr sekvenačních aplikací předurčený zejména pro velké sekvenační studie prováděné v specializovaných centrech. HiSeq X Ten je nejvýkonnější sekvenační platforma cílená

pro populační studie překonávající cenovou bariéru 1 000 \$ za osekvenování jednoho lidského genomu. Tato platforma se skládá z 10 ultra vysokokapacitních sekvenátorů, které jsou společně schopny osekvenovat více než 18 000 genomů za rok. HiSeq X Ten umožňuje cenově dostupnější a dosažitelnější sekvenování lidského genomu než cokoli jiného kdy předtím [11]. Sekvenátory Illumina jsou limitovány relativně krátkou délkou sekvenačních čtení v závislosti na typu přístroje, např. 2 × 125 (HiSeq 2500) 2 × 150 (NextSeq 500) nebo až 2 × 300 (MiSeq) bází. Tato limitace je dána zvýšenou nebo sníženou účinností inkorporace nukleotidu a selháním při odstraňování nebo přidávání terminační skupiny, což může způsobit nekompletní prodloužení vlákna. Proto je nejčastější chyba, která vzrůstá s délkou čtení, substituce nukleotidu. Další nevýhoda je nerovnoměrné pokrytí (tzv. coverage) v oblastech bohatých na AT a GC sekvenace. V porovnání se Sangerovým sekvenováním jsou Illumina sekvenátory schopné produkovat mnohem více dat za méně času i peněz, ale s vyšší chybovostí vedoucí k falešné pozitivě při identifikaci sekvenačních variací [6]. Ovšem díky ultra vysoké výkonosti, kapacitě a cenové hospodárnosti provozu sekvenátory Illumina v současnosti ovládají trh a využívají se k většině celogenomových i resekvenačních aplikací zahrnujících lidský genom i genomy modelových organismů [8].

Life Technologies/SOLiD

V roce 2007 představila tehdy ještě společnost Applied Biosystems (dnes Life Technologies) platformu SOLiD (sequencing by oligonucleotide ligation and detection) pro sekvenování druhé generace. Na rozdíl od předchozích dvou je SOLiD technologie založena na sekvenování ligací. DNA knihovna se připravuje pomocí emPCR a k fragmentům DNA se připojí krátké adaptory komplementární k adaptorům imobilizovaným na povrchu magnetických kuliček. Po amplifikaci jsou kuličky kovalentně navázány na sklíčko se speciálně upraveným povrchem, které se vloží do kazety umožňující fluidní průtok. SOLiD systém využívá osm nukleotidů dlouhé sondy. Každá ze sond má známou

sekvenci prvních dvou bází, je označena jednou ze čtyř různých fluorescenčních barev, přičemž každá barva představuje 4 z 16 možných di-nukleotidových sekvencí. Solid technologie zaručuje přečtení každého nukleotidu 2krát, což velice zvyšuje přesnost, s jakou je určeno pořadí nukleotidů dané sekvence. Mezi výše uvedenými NGS platformami má tedy SOLiD systém nejnižší chybovost. Jeho nejběžnějším typem chyby je substituce nukleotidu. Využití nachází především v aplikacích, jako je celogenomové resekvenování, cílené resekvenování, transkriptomová analýza a epigenomika (chromatinová imunoprecipitace a metylace). V současnosti jsou v nabídce dvě varianty SOLiD sekvenátoru: 5500 System a 5500xl System. Z několika dnes dostupných platform je obtížné vybrat jednu optimální. Ze třech výše zmíněných NGS technologií Illumina HiSeq generuje nejvíce dat za nejnižší cenu, SOLiD System má nejvyšší přesnost a Roche 454 poskytuje největší délku čtení.

Life Technologies/Ion torrent

V roce 2010 představila firma Life Technologies přístroj Ion Personal Genome Machine (PGM) založený na nové technologii schopné přímo převádět chemický signál do digitální podoby. Místo optického způsobu zaznamenávání jednotlivých nukleotidů se zde využívá detekce vodíkových protonů uvolněných v průběhu syntézy nově vznikajícího řetězce katalyzovaného DNA polymerázou. Proces probíhá na polovodičovém čipu hustě pokrytém mikrojamkami, pod nimiž je umístěna na ionty citlivá vrstva. Inkorporace nukleotidu způsobí uvolnění H⁺, čímž dojde ke změně pH, kterou zaznamenává detektor. K přípravě knihovny se opět využívá emPCR. Kuličky s templátem jsou poté deponovány na čip tak, že v každé jamce je pouze jedna molekula DNA. Čip je postupně zaplavován jednotlivými druhy nukleotidů a dochází k syntéze DNA. Pokud nukleotid není komplementární, detektor zaznamená nulový signál. Dojde-li k začlenění dvou nukleotidů, je signál dvojnásobný. Díky tomu, že technologie nepoužívá žádné fluorescenční detektory, kamery, skenery atp., trvá jeden sekvenační běh méně

než 2 hod [5]. Technologie je velice jednoduchá, rychlá a levná. Celkové množství produkovaných dat je určeno hustotou jamek na čipu. V roce 2012 byla představena nová generace polovodičového sekvenátoru – Ion Proton s kapacitou čipu slibující dostatečnou kapacitu i pro sekvenaci lidského genomu.

Technologie tzv. single-molecule sekvenování

Technologie single-molecule sekvenování představuje výraznou změnu ve vývoji nových sekvenačních metod. Tato technologie, někdy označovaná jako třetí generace sekvenování, přináší hned několik výhod. Nevyužívá žádný amplifikační krok před vlastním sekvenováním, což zkracuje dobu přípravy DNA, redukuje cenu, snižuje chybovost pramenící z amplifikace, umožňuje vyšší flexibilitu v délce čtení a přesnou kvantifikaci DNA molekul, protože signál je zaznamenáván v reálném čase [9].

První dostupnou technologií třetí generace byla platforma Helicos Genetic Analysis System využívající sekvenace syntézou. Vytvoří se jednovláknová DNA knihovna, která je neuspořádaně deponována na plochou destičku. Destička je v každém sekvenačním cyklu zaplavována DNA polymerázou a jedním ze čtyř fluorescenčně značených nukleotidů a signál je zaznamenán CCD kamerou. Po promytí se odstraní fluorescenční značky a prodloužování řetězce se opakuje [9]. V současné době není tato technologie dále vyvíjena.

Další z třetí generace sekvenačních technologií tzv. SMRT (single-molecule real-time) byla vyvinuta společností Pacific Bioscience. Tento systém využívá nanostruktury zvané Zero Mode Waveguide – destičky s deseti tisíci jamkami o průměru 10 nm. Během sekvenačního procesu se komplementární vlákno syntetizuje pomocí DNA polymerázy ukotvené na dně každé jamky. Fluorescenční značka je umístěna na fosfátové skupině nukleotidu, což má za následek uvolnění záblesku zároveň s jeho inkorporací. Proces inkorporace i uvolnění fluorescence trvá po určitou dobu, čehož se využívá pro určení identity báze. Tento přístup nevyžaduje promývací kroky při začleňování jednotlivých typů nuk-

leotidů, a zrychluje tak běh sekvenování. V současnosti poskytuje sekvenátor Pacific Bioscience model PacBio RS II největší délku čtení a extrémně vysokou přesnost. Využívá se zejména pro resekvenační projekty na malých prokaryotických i eukaryotických genomech díky schopnosti sekvenovat ultra dlouhé úseky (v průměru 4 000 bází). To umožňuje přesnější mapování na referenční sekvence.

Dalším příkladem využití nanotechnologie pro novou generaci sekvenování je tzv. nanopore sequencing. Koncept využití nanopóru jako biosenzoru byl navržen už v polovině 90. let, kdy začal výzkum nanopóru na půdě akademických institucí, jako je Oxford či Harvard. V roce 2005 vznikla společnost Oxford Nanopore s cílem převést akademický výzkum do komerční sféry [12]. Technologie je založena na biologických vlastnostech nanopóru. Nanopóry jsou součástí proteinových kanálků v membránách a dovolují výměnu iontů. Nanopórem protéká konstantní proud. Analyt, kterým je v případě využití pro sekvenování jednořetězcová molekula DNA, prochází nanopórem a dochází k detekci jednotlivých nukleotidů, přičemž pro každý typ nukleotidu je předem určena modulace proudu. Využití technologie nanopóru pro sekvenování DNA nabízí mnoho výhod oproti stávajícím platformám. Technologie má minimální požadavky na reagenty i přípravu vzorku, je levná, rychlá a nabízí analýzu DNA v reálném čase. Sekvenování stejné molekuly DNA může být neustále opakováno. Jednotlivá čtení mohou být dlouhá až desítky kilobází. Většina současných sekvenačních technik je ve srovnání s technologií nanopóru komplikovaná – vyžaduje kromě izolace DNA i její značení a namnožení, rozbití na malé fragmenty, které jsou pak mnohonásobně sekvenovány. I technologie nanopóru má však svá úskalí, která je nutno vyřešit, než na trh přijde první „nanotech“ sekvenátor. Vysoká rychlost, s jakou je DNA translokována skrz nanopór, totiž způsobuje problémy s rozlišením signálu nukleotidu od signálu pozadí. V roce 2013 bylo publikováno několik prací, které posunují řešení tohoto problému dále [13–15]. Zjistilo se

např., že působením světla o určité vlnové délce lze docílit zpomalení průtoku DNA skrz nanopór. Technologie nanopóru prošla rozličnými technickými zlepšeními, která umožnila lepší rozlišení i stabilitu nanopóru. V roce 2012 ohlásila firma Oxford Nanopore příchod prvního sekvenátoru – GridION System, který slibuje přečtení celého lidského genomu v 15 minutách. Nedávno byl také představen miniaturizovaný sekvenátor, jenž se vejde do kapsy – MinION od Oxford Nanopore schopný přečíst DNA fragmenty o velikosti do 10 kilobází. V současnosti jsou oba systémy ještě komerčně nedostupné.

Aplikace NGS technologií

Schopnost NGS technologií produkovat obrovské množství sekvenačních dat v poměrně krátké době za relativně nízkou cenu je dělá užitečnými nástroji pro řadu aplikací, např. *de novo* genomové sekvenování, celogenomové nebo cílené resekvenování pro objevování nových mutací a polymorfizmů, analýza transkriptomu a DNA metylovaných oblastí, mapování DNA-proteinových interakcí pomocí chromatinové imunoprecipitace (ChIP-Seq) atd. Nástup NGS technologií umožnil charakterizovat molekulární podstatu nejrozličnějších onemocnění. NGS technologie nacházejí široké uplatnění v molekulární diagnostice dědičných chorob, infekčních onemocněních, prenatální diagnostice, farmakogenomice, v molekulární diagnostice nádorů i jejich prognóze [16]. Nádorové onemocnění je způsobeno nahromaděním mutací v genetickém materiálu. Tyto mutace, které mohou být germinální (zděděné od rodičů) i somatické (získané v průběhu života), mají zásadní efekt na onkogeny, nádorové supresory nebo geny mající na starosti reparaci DNA, umožňují uniknout kontrolním buněčným mechanismům vedoucím v konečném důsledku ke vzniku nádoru. Studium mutačních profilů jednotlivých typů nádorů tedy významně pomáhá objasnit mechanismy kancerogeneze. V posledních několika letech bylo pomocí NGS technologií provedeno velké množství studií, které poskytly komplexnější molekulární charakterizaci nádorových onemocnění

a vedly k objevení nových genů asociovaných zejména s rakovinou mléčné žlázy, vaječnicků, tlustého střeva a konečníku, plic, jater, ledvin, rakovinou hlavy a krku, melanomem a akutní myeloidní leukemií [17] a k identifikaci velkého počtu rekurentních mutací (identické mutace detekované ve velkém počtu vzorků) [18], které byly standardními cytogenetickými technikami nezachytitelné. NGS technologie se ukázaly být velice slibným diagnostickým nástrojem pro identifikaci germinálních mutací, jež jsou podkladem familiárních syndromů. V případě familiárního melanomu jsou známy pouze dvě mutace odpovědné za rozvoj onemocnění. Mutace v *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) se podílí na 40 % familiárních případů melanomu, kdežto mutace v *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*) byla nalezena jen u velmi malého počtu probandů. Sekvenování nové generace probandů z několika rodin s výskytem familiárního melanomu odhalilo pro melanom novou rizikovou variantu c.G1075A genu *MITF* (*microphthalmia-associated transcription factor*) [18].

Celogenomové sekvenování

Celogenomové sekvenování zahrnuje *de novo* sekvenování a tzv. resekvenování. Při resekvenování se sekvenují stejné genomy jako u *de novo* přístupu, ale s tím rozdílem, že je k dispozici referenční sekvence, na kterou se nová sekvence zpětně mapuje. Výhoda celogenomového sekvenování je sekvenace celé chromozomální DNA, pokrytí promotorových a regulačních sekvencí a tím i poskytnutí informace o úplném mutačním profilu daného genomu zahrnujícím bodové mutace, malé inserce a delece, chromozomální změny a strukturní variace typu CNVs (copy number variations). Celogenomové sekvenování se proto nejvíce využívá k identifikaci nových a vzácně se vyskytujících mutací [16]. První celogenomový sekvenační projekt byl realizován na nádorovém a normálním vzorku téhož pacienta s cytogeneticky normální akutní myeloidní leukemií (AML) v roce 2008 [19] a vedl k identifikaci osmi nových somatických mutací zúčastněných v patogenezi AML a několika somatických insercí

a delecí. Pomocí celogenomového sekvenování lze také úspěšně detekovat chromozomální přestavby. Znalost chromozomálních translokací je velmi důležitá z biologického i klinického pohledu. Například Gleevec® byl vyvinut pro inhibici fúzní tyrozinkinázy Bcr/Abl – chromozomální přestavby typické pro chronickou myeloidní leukémii (CML). CML je nádorové onemocnění se specifickou chromozomální aberací tzv. Philadelphským chromozomem, kde vzniká fúzní gen *BCR-ABL*. Produktem toho genu je tyrozinkináza fosforylující celou řadu proteinů klíčových pro proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk. Gleevec je příklad léku, který byl vyvinut na základě molekulární podstaty CML. Podobné chromozomální přestavby u solidních tumorů byly zatím charakterizovány jen chabě z důvodu nedostatku systematických přístupů, avšak s nástupem NGS technologií je detekce chromozomálních aberací i u solidních nádorů realizovatelná a cenově dostupná. Nedávná studie objevila translokace genů *EML4-ALK* (*echinoderm microtubule associated protein like 4 – EML 4, anaplastic lymphoma kinase – ALK*) u nemalobuněčného karcinomu plic a také *TMPRSS2-ERG* (*transmembrane protease serine 2 – TMPRSS2, ETS-related gene – ERG*) u karcinomu prostaty [20]. Celogenomové sekvenování je velmi výhodným přístupem pro nalezení nových potenciálně terapeutických cílů.

Exomové sekvenování

Exomové sekvenování je přístup tzv. cíleného sekvenování, kdy jsou sekvenovány pouze kódující oblasti – exomy. Lidský exom představuje asi 1 % velikosti celého lidského genomu, exomové sekvenování je tudíž snazší, cenově méně náročné a umožňuje vyšší pokrytí (coverage). Pomocí celoexomového sekvenování (whole exome sequencing – WES) byly např. úspěšně identifikovány mutace odpovědné za familiární nádory pankreatu [21], dědičného feochromocytomu [22] či familiárního melanomu [23]. Studium mutačního profilu adenokarcinomu plic odhalilo nové mutace v řadě protoonkogenů (*ERBB4, KDR, FGFR4* a *NTRK*) a nádorových supresorů (*NF1, RB1, ATM* a *APC*), jejichž znalost na-

bízí nové způsoby léčby. Podobně byly u glioblastomu detekovány aberace *RTK, TP53, RB* signální dráhy a mutace v *NF1*, které mohou v budoucnu vést k vývoji inhibitorů drah MEK, nebo RAF a k zefektivnění léčby [20]. Velký počet WES studií nových genetických aberací je shrnut v práci Tran et al [24].

Sekvenování transkriptomu

Transkriptom představuje soubor všech molekul RNA (mRNA, rRNA, tRNA a další nekódující RNA molekuly). Transkriptomová analýza je jedním z nejdůležitějších přístupů pro komplexní molekulární charakterizaci nádorů. Sekvenování transkriptomu (RNA-seq) velmi usnadnilo detekci mezigenových fúzí, somatických mutací a alternativních sestřihových variant. Na rozdíl od čipových technologií není technologie RNA-seq limitována předchozí znalostí genomu, dynamickým rozlišením nebo zkříženou (cross) hybridizací. Fúze genů jsou v genomech nádorů (převážně u hematologických malignit) velmi časté. Pomocí RNA-seq byly objeveny nové fúze genů např. u rakoviny mléčné žlázy, prostaty, lymfomu a melanomu [9]. Výskyt určitých fúzí genů je spojován s procesem kancerogeneze specifických tkání nebo orgánů a tyto změny mohou být využity jako diagnostické markery onemocnění. Některé fúze byly naopak nalezeny napříč několika rozdílnými druhy nádorů. Takovým příkladem je fúze genů z RAF signální dráhy, která byla identifikována u karcinomu prostaty, žaludku i melanomu [9], mající potenciál terapeutického cíle pro všechny tři malignity. RNA-seq umožňuje studium i nekódujících ncRNA molekul, jež se účastní širokého spektra biologických procesů zahrnujících regulaci proliferace, diferenciace a apoptózy. Typickým příkladem jsou mikroRNA (miRNA) jako klíčové regulátory genové exprese.

Cílené sekvenování vybraných oblastí

Cílené sekvenování (targeted sequencing) je inovativní technika, která umožňuje sekvenovat pouze vybrané geny nebo definované oblasti genomu, což šetří čas, peníze a vyžaduje i méně pro-

storu pro skladování dat. Typicky se tato technika využívá pro sekvenování velkého počtu vzorků při screeningu nebo validaci genetických variant v populaci. NGS zde umožňuje identifikovat vzácnější varianty, které nejsou Sangerovým sekvenováním zachytitelné, anebo je jejich identifikace příliš drahá. Využije-li se pro cílené sekvenování vysokého pokrytí (coverage), mohou být tímto způsobem charakterizovány neobvyklé sekvenovací varianty v populaci s frekvencí o četnosti pod 1 %. Amplikonové sekvenování je vhodné do klinického prostředí pro odhalování somatických mutací v komplexních biologických vzorcích, jako je např. smíšený vzorek nádorové a normální DNA.

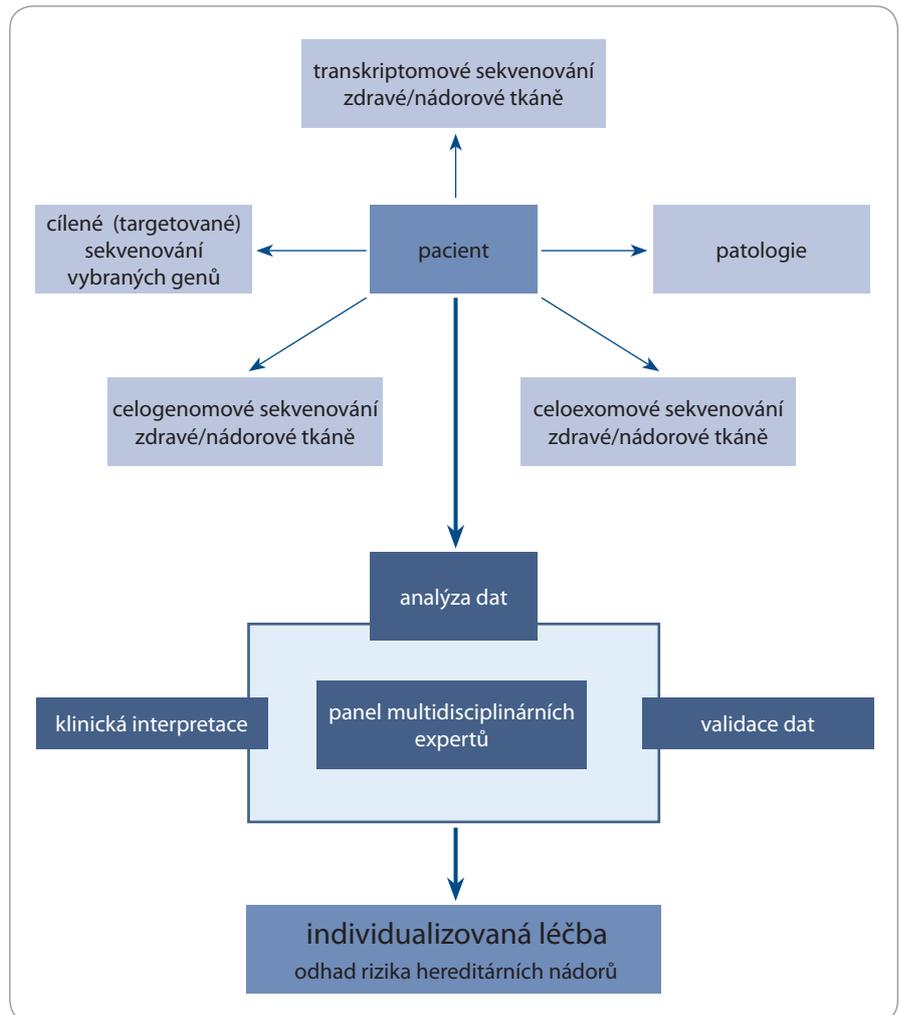
U targetovaného sekvenování existují dnes tři rozdílné způsoby přípravy knihovny – multiplex PCR, single-plex PCR a tzv. targeted capture (cílený „zachyt“) s následnou multiplex PCR. Technika multiplex PCR je reprezentována AmpliSeq technologií, kterou nabízí Life Technologies. Je možné využít až 6 144 párů primerů, jež se smíchají v jedné PCR zkumavce a umožní selektivní amplifikaci oblasti našeho zájmu. AmpliSeq technologie vyžaduje pouze 10 ng vstupní DNA z různých typů nádorových vzorků včetně FFPE. Nedávno byla tato technologie upravena i pro amplifikaci celého lidského exomu. K tomuto účelu byl navržen Ion AmpliSeq Exome kit s 294 000 páry primerů [25]. Obohacení vzorku založené na single-plex PCR představuje technika zvaná Microdroplet PCR od RainDance Technologies. Umožňuje vysoce efektivní simultánní amplifikaci až 4 000 vybraných sekvencí na jeden vzorek. Další technikou přípravy amplikonové knihovny je Access Array System od společnosti Fluidigm. Tato technologie využívá metodu, která umožňuje amplifikovat 48 různých vzorků s použitím až 48 rozdílných párů primerů. Poslední technika přípravy amplikonové knihovny využívá specifických sond pro zachyt oblastí našeho zájmu a následného obohacení vzorku o tyto oblasti pomocí PCR. Tyto hybridní techniky jsou reprezentovány technologiemi TrueSeq Amplicon od společnosti Illumina, HaloPlex od Agilent Technologies a SeqCap EZ technology od společnosti

Roche NimbleGen. Jak Microdroplet PCR, tak Access Array System jsou vhodné zejména pro sekvenování několika genů ve velkém množství vzorků. V opačném případě (velké množství genů v malém počtu vzorků) jsou tyto techniky neekonomické. Obě technologie vyžadují také přídatné specializované vybavení, což představuje jejich další nevýhodu. Klinickému využití nejlépe vyhovují techniky AmpliSeq, TruSeq Amplicon, HaloPlex a SeqCap EZ System, jelikož jsou vhodné pro sekvenování stovek genů v malém, ale i větším počtu vzorků. Příprava knihovny zabere pouze jeden den. Senzitivita a specifita je srovnatelná.

Lze si vybrat ze standardních kitů navržených např. i pro záchyt nejběžnějších mutací u onkologických pacientů – tzv. nádorové panely – nebo si navrhnout projekt dle oblastí vlastního zájmu. Společnost Ambry Genetics vyšla vstříc klinickým potřebám a vyvinula několik diagnostických kitů pro záchyt hereditárních nádorových onemocnění za využití NGS technologií. Společnost GeneDx se rovněž specializuje na testování vzácných hereditárních poruch a nabízí komplexní panel 29 genů významně asociovaných s vrozenými nádorovými onemocněními nebo panely zaměřené na jednotlivé nádorové typy.

Využití NGS v onkologické praxi

Pomocí sekvenování nové generace byly identifikovány nové genetické změny přispívající k onkogenezi, nádorové progresi i metastazování. Významných pokroků v identifikaci nových s nádory asociovaných genů bylo dosaženo u nádorů mléčné žlázy, ovaria, tlustého střeva a konečníku, plic, jater, renálního karcinomu, u nádorů hlavy a krku, melanomu a akutní myeloidní leukémie [17]. NGS objevy nových s nádory asociovaných genů jsou shromažďovány na celosvětově dostupných portálech. Například National Cancer Institute (NCI) podpořil úspěšný projekt vytvoření atlasu nádorových genů – The Cancer Genom Atlas (TCGA) za účelem zlepšit nádorovou prevenci, včasnou detekci a léčbu. Další projekt z oblasti nádorové genomiky podporovaný International Cancer Genome Consortium (ICGC) je Cancer Genome Projekt. Ten si klade za cíl komplexně



Obr. 1. Shrnutí workflow integrace omických dat.

U daného pacienta je osekvenován nádorový a zdravý genom. Genetická informace je analyzována a interpretována multidisciplinárními experty. Pacientovi je navržena léčba „šitá na míru“. Z analýzy profituje také pacientova rodina, protože se zjistí i hereditární riziko vzniku nádorového onemocnění a mohou být provedena příslušná opatření [16].

charakterizovat genomické, transkriptomické a epigenomické změny u 50 různých nádorů nebo jejich subtypů, které mají klinickou i společenskou důležitost.

WGS poprvé ukázalo svůj diagnostický potenciál u pacienta s nejednoznačnou diagnózou akutní myeloidní leukemie neznámého typu. Sekvenováním byla zjištěna fúze *PML-RARA* genů potvrzující diagnózu akutní promyeloidní leukemie vedoucí ke změně terapie a zlepšení prognózy [16]. Walsh et al [26] pomocí cíleného přístupu detekovali 21 nových mutací asociovaných s hereditárními nádory mléčné žlázy a vaječníku. Testování *BRCA* genů se standardně provádí pomocí PCR a následného Sangerova sek-

venování produktů. Větší exonové delece a duplikace se dodatečně testují pomocí MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Dodatečné testování je avšak omezeno pouze na známé variace. Díky tomu je výsledek testu u mnoha pacientů s hereditární dispozicí negativní. NGS studie provedená mezi 300 rodinami s hereditárním výskytem rakoviny prsu odhalila předtím nedetekované mutace u 52 probandů [16]. Na základě výsledků této studie byla vyvinuta metoda kombinující amplifikaci dlouhých úseků pomocí PCR a jejich NGS sekvenaci pro detekci mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* [27]. Technologie sekvenování nové generace je díky vývoji

malých stolních sekvenátorů dostupná i pro klinické aplikace. Je vhodná především pro sekvenování vybraných panelů genů. Díky tomu je analýza a interpretace dat méně náročná. Kombinace všech NGS technik poskytuje globální pohled na nádorový genom. Onkologická praxe stojí na pokraji doby, kdy budou mít lékaři k dispozici osekvenovaný nádorový/zdravý genom pacienta dříve, než rozhodnou o způsobu léčby. Na obr. 1 je shrnuto workflow takové integrace genomických, transkriptomických a epigenomických dat.

Závěr

Zavedení sekvenačních metod nové generace do klinické praxe je stále limitováno několika faktory. První z nich je cena celogenomového sekvenování. Cíl, za kterým se ubírá vývoj NGS technologií, je dosažení ceny 1 000 \$ za jeden kompletní sekvenační běh s průměrným pokrytím 30krát. Zdá se, že nový sekvenátor společnosti Illumina nedávno uvedený na trh bude schopen dosáhnout cenového limitu 1 000 \$. Za jak dlouho bude využitelný pro rutinní klinickou praxi, zůstává otázkou. Druhý limitující faktor je obrovské množství generovaných dat, pro která je nutné nalézt způsob uchování pro pozdější analýzu a interpretaci výsledků. Náklady plynoucí z uchování a interpretace tak velkého množství dat jsou mnohdy vyšší než náklady na vlastní sekvenování, což si malé diagnostické laboratoře nemohou dovolit. Další komplikací je absence standardu pro určení kvality sekvenačních dat. Je známo, že každá z platform NGS má specifický typ chyb. Správně rozlišit mezi genetickou variantou a chybou sekvenační platformy je nezbytné pro následné rozhodování o typu léčby. Rozdílné bioinformatické strategie se také mohou odrazit na výsledku analýzy

dat. Kromě jiného vyvstává také etická otázka nakládání s NGS daty a jejich zpětného předávání pacientům. Realita NGS dat je zatím taková, že klinicky a biologicky důležitá informace zůstává často pohřbena v obrovském množství falešně pozitivních či negativních výsledků. Zavedení NGS technologie do klinické praxe má tedy před sebou ještě četné překážky. K uvedení do klinické praxe je nyní nejbližší genetické testování hereditárních syndromů. Navzdory všem výše popsaným problémům poskytuje NGS nebyvalé příležitosti pro studium molekulární podstaty nádorových onemocnění.

Literatura

1. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 1944; 79(2): 137–158.
2. Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1953; 18: 123–131.
3. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(2): 560–564.
4. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(12): 5463–5467.
5. Liu L, Li Y, Li S et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 251364. doi: 10.1155/2012/251364.
6. Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11(1): 31–46. doi: 10.1038/nrg2626.
7. Zhou X, Ren L, Meng Q et al. The next-generation sequencing technology and application. *Protein Cell* 2010; 1(6): 520–536. doi: 10.1007/s13238-010-0065-3.
8. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF et al. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 2012; 21(8): 1794–1805. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x.
9. Xuan J, Yu Y, Qing T et al. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* 2013; 340(2): 284–295. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.025.
10. Quince C, Lanzen A, Curtis TP et al. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Methods* 2009; 6(9): 639–641. doi: 10.1038/nmeth.1361.
11. Illumina.com [homepage on the Internet]. Illumina, Inc.; c2014 [updated 2014; cited 2014 Mar 19]. Available from: <http://www.illumina.com/systems.ilmn>.
12. Nanoporetech.com [homepage on the Internet]. Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK;

c2008–2014 [updated 2014; cited 2014 Mar 17]. Available from: <https://www.nanoporetech.com/technology/introduction-to-nanopore-sensing/introduction-to-nanopore-sensing>.

13. Di Fiori N, Squires A, Bar D et al. Optoelectronic control of surface charge and translocation dynamics in solid-state nanopores. *Nat Nanotechnol* 2013; 8(12): 946–951. doi: 10.1038/nnano.2013.221.
14. Squires AH, Hersey JS, Grinstaff MW et al. A nanopore-nanofiber mesh biosensor to control DNA translocation. *J Am Chem Soc* 2013; 135(44): 16304–16307.
15. Anderson BN, Muthukumar M, Meller A. pH tuning of DNA translocation time through organically functionalized nanopores. *ACS Nano* 2013; 7(2): 1408–1414. doi: 10.1021/n3051677.
16. Guan YF, Li GR, Wang RJ et al. Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chin J Cancer* 2012; 31(10): 463–470. doi: 10.5732/cjc.012.10216.
17. Shyr D, Liu Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application. *Biol Proced Online* 2013; 15(1): 4. doi: 10.1186/1480-9222-15-4.
18. Ku CS, Cooper DN, Ziogas DE et al. Research and clinical applications of cancer genome sequencing. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013; 25(1): 3–10. doi: 10.1097/GCO.0b013e32835af17c.
19. Ley TJ, Mardis ER, Ding L et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 2008; 456(7218): 66–72. doi: 10.1038/nature07485.
20. Dong H, Wang S. Exploring the cancer genome in the era of next-generation sequencing. *Front Med* 2012; 6(1): 48–55. doi: 10.1007/s11684-012-0182-x.
21. Jones S, Hruban RH, Kamiyama M et al. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 2009; 324(5924): 217. doi: 10.1126/science.1171202.
22. Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet* 2011; 43(7): 663–667. doi: 10.1038/ng.861.
23. Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 2011; 480(7375): 99–103. doi: 10.1038/nature10630.
24. Tran B, Dancy JE, Kamel-Reid S et al. Cancer genomics: technology, discovery, and translation. *J Clin Oncol* 2012; 30(6): 647–660. doi: 10.1200/JCO.2011.39.2316.
25. Chang F, Li MM. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing in cancer. *Cancer Genet* 2013; 206(12): 413–419. doi: 10.1016/j.cancergen.2013.10.003.
26. Walsh T, Lee MK, Casadei S et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(28): 12629–12633. doi: 10.1073/pnas.1007983107.
27. Ozelik H, Shi X, Chang MC et al. Long-range PCR and next-generation sequencing of BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *J Mol Diagn* 2012; 14(5): 467–475. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.03.006.

Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi

Development of PCR Methods and Their Applications in Oncological Research and Practice

Hrstka R., Kolářová T., Michalová E., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

PCR metoda se velmi krátce od svého objevení stala rutinní metodou molekulárně biologických výzkumných laboratoří a nepostradatelným nástrojem diagnostické medicíny. Za dobu svého využívání byla rozvinuta do řady variant, které specificky reagují na potřeby výzkumu a diagnostiky co do použitého vstupního materiálu a jeho množství, podmínek reakce a nově vyvinutých technologií. Předložená práce stručně shrnuje jednotlivé PCR přístupy s důrazem na jejich využití v onkologickém výzkumu a praxi.

Klíčová slova

polymerázová řetězová reakce (PCR) – PCR v reálném čase – digitální PCR – klinická onkologie

Summary

Since its discovery, PCR has become a conventional method of molecular biology research laboratories and an indispensable tool in diagnostic medicine. Multiple variants of the PCR technique were developed, which enable the analysis of different biological materials at different amounts and reaction conditions. This article briefly summarizes the PCR approaches and points out their applications in oncological research and practice.

Key words

polymerase chain reaction (PCR) – real-time PCR – digital PCR – clinical oncology

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), BBMRI_CZ (LM2010004), GAČR 13-00956S a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), BBMRI_CZ (LM2010004), GAČR 13-00956S and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Roman Hrstka, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: hrstka@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 10. 2. 2014

Přijato/Accepted: 1. 4. 2014

Úvod

Prvním zásadním krokem vedoucím k objevu a následnému zavedení polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) byla práce publikovaná na konci 60. let minulého století popisující nový druh termofilní bakterie tehdy nazvané *Thermus aquaticus*. Krátce na to byla z tohoto mikroorganismu izolována termostabilní polymeráza nazvaná „Taq polymeráza“ a v polovině 80. let minulého století pak americký chemik K. Mullis objevil PCR, za což byl v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou za chemii. Význam a originalitu tohoto objevu podtrhuje článek otištěný v amerických novinách The New York Times, který na základě tohoto objevu rozděluje biologii do dvou epoch – „před PCR“ a „po PCR“. Zavedení PCR do praxe tak odstartovalo obrovský rozmach molekulární biologie a významně rozšířilo do té doby relativně omezené portfolio molekulárně-biologických metod.

Polymerázová řetězová reakce je metoda umožňující amplifikaci (tj. zmnožení) specifického úseku nukleové kyseliny, přičemž využívá obecných rysů replikace DNA. Podstatou metody je mnohonásobná syntéza komplementárního řetězce pomocí příslušné DNA polymerázy, a to v rámci sekvence vymezené krátkými syntetickými oligonukleotidy (ssDNA, 15–30 b), tzv. primery, které jsou odvozeny od dané sekvence. Teoreticky lze z jedné molekuly templátu získat 2^n kopií dané sekvence při n cyklech. Toto zmnožení následně umožňuje vizualizaci amplifikovaného produktu, jenž nejčastěji probíhá s využitím agaróзовé gelové elektroforézy (obr. 1A). PCR reakce byla za dobu jejího využívání rozvinuta do řady variant, které specificky reagují na potřeby výzkumu a diagnostiky co do použitého vstupního materiálu a jeho množství, podmínek reakce a nově vyvinutých technologií.

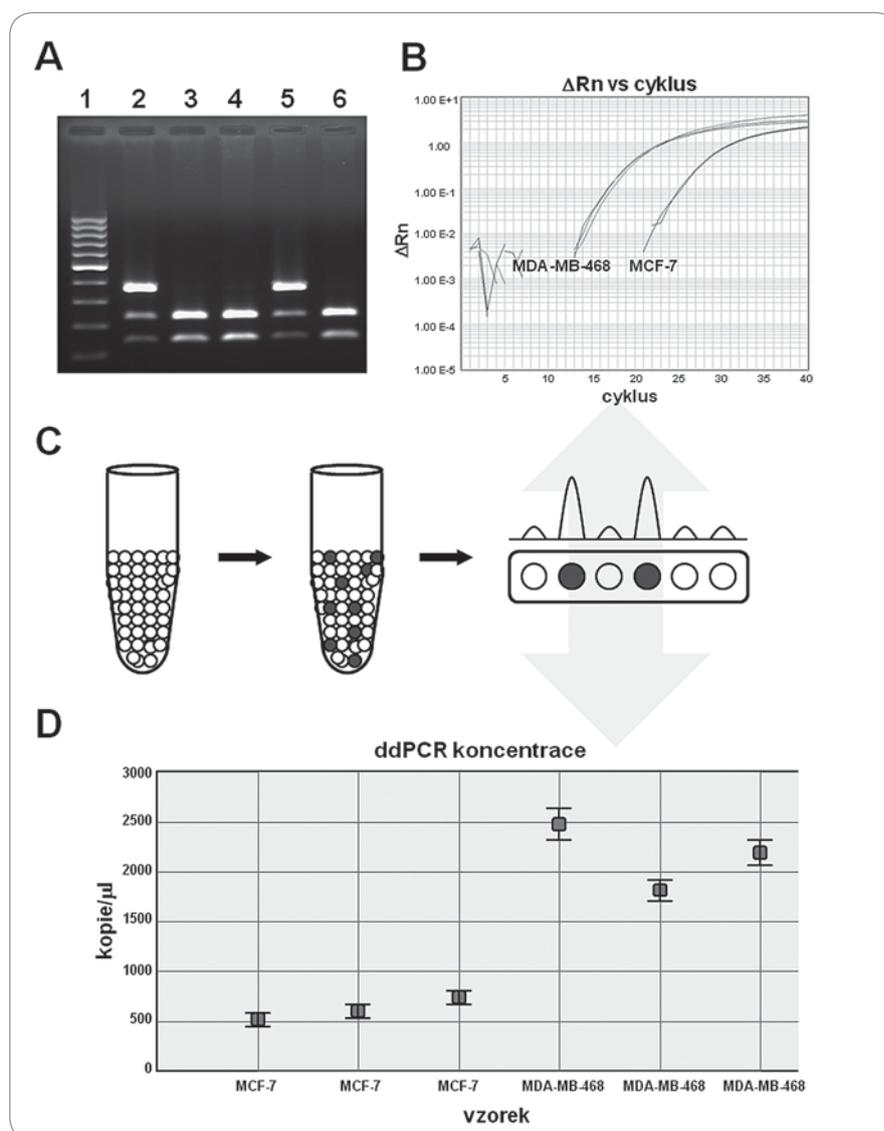
Využití PCR v onkologii

PCR je stejně jako mnoho dalších molekulárně-biologických analýz díky svým přednostem, jako je časová a materiálová úspora, možnost automatizace a dobrá reprodukovatelnost, využívána ve stále širším měřítku v rámci preventivních programů zaměřených na sta-

novení rizika vzniku onemocnění, při diagnostice patologických stavů i určení prognózy onemocnění. PCR se rovněž uplatňuje v rámci tzv. farmakogenetických vyšetření, při nichž je sledována genetická predispozice pro lékovou odpověď, tj. predikována bezpečnost či toxicita a účinnost terapeutické látky pro konkrétního pacienta.

PCR, obvykle ve spojení s dalšími molekulárně-biologickými technikami (elektroforéza, RFLP, sekvencování), umožňuje detekovat různé typy mutací spojené s vyšším rizikem vzniku ná-

doru a pomáhá tak zlepšit preventivní screeningové programy nádorových onemocnění či podrobněji charakterizovat typ nádoru pro následnou volbu účinnější terapie. Příkladem vyšetření prováděných v Masarykově onkologickém ústavu mohou být detekce mutací specifických genů spojených s genetickou predispozicí ke vzniku nádoru, kdy příslušná sekvence genu je nejprve amplifikována pomocí PCR a získané amplicony následně sekvencovány. Jedná se např. o geny *BRCA1*, *BRCA2* u hereditárního syndromu nádoru prsu a/nebo va-



Obr. 1. Přehled stěžejních PCR technologií.

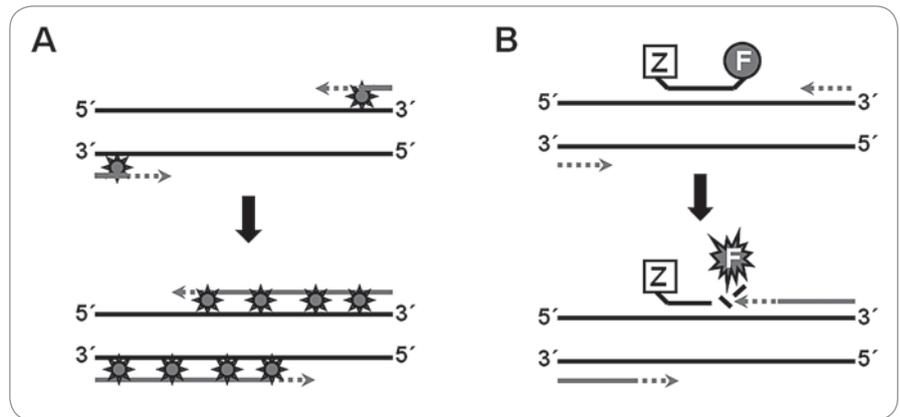
A. Tradiční PCR; B. PCR v reálném čase; C. digitální PCR – schematická ukázka frakcionace vzorku a následné vyhodnocení; D. konkrétní ukázka výsledků získaných pomocí digitální PCR (ddPCR), pro zajímavost tytéž vzorky byly paralelně analyzovány pomocí PCR v reálném čase viz část B.

ječníku; geny *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* u hereditárního nepolypózního karcinomu tlustého střeva – tzv. Lynchova syndromu; transkripční varianty p16/INK4a a p14/ARF genu *CDKN2A* u familiárního maligního melanomu; gen *TP53* u Li-Fraumeniho syndromu; nebo gen *CDH1* u hereditární formy difúzního karcinomu žaludku. Dalším příkladem je vývoj metod detekce volných nádorových buněk v krevním řečišti či lymfatických uzlinách na principu PCR, který má zásadní význam pro hodnocení metastatického potenciálu buněk a vývoje onemocnění a tím i volby příslušné terapie. Analogicky se PCR případně RT-PCR (reverse transcription PCR) využívá při sledování minimální reziduální nemoci zejména u hematologických malignit, při níž se hodnotí počet přítomných nádorových buněk, např. detekcí transkriptu fúzního genu *bcl-abl* v případě chronické myeloidní leukemie (chronic myeloid leukaemia – CML). Kromě identifikace vlastních nádorových markerů je PCR, zejména pak kvantitativní PCR (viz dále), významným nástrojem při stanovení přítomnosti patogenních organismů u onkologických pacientů při septických stavech. Základem testu je amplifikace specifické sekvence patogenu v odebraném biologickém vzorku a oproti klasické mikrobiologické kultivaci představuje značnou časovou úsporu a pro pacienta tedy rychlejší nasazení účinné léčby.

V rámci experimentální onkologie se PCR využívá především při technikách klonování, tj. vnášení cizorodé DNA do vektorových systémů, kdy současně představuje i základní nástroj pro ověřování přítomnosti specifických sekvencí ve sledovaném genomu. PCR je využívána i v případě čipových technologií, při nichž je analyzována úroveň transkripce několika až stovek genů současně a sledovány reakce buněk na specifické podmínky indukci vybraných signálních drah, exprese specifických genů a syntézou specifických proteinů.

PCR v reálném čase (kvantitativní)

Dalším revolučním krokem bylo zavedení kvantitativní PCR (quantitative PCR – qPCR) neboli PCR v reálném čase



Obr. 2. Princip využití nespecifických a specifických sond při PCR v reálném čase.

A. Nespecifická próba (nejčastěji SYBR Green) se váže na dsDNA, čímž dochází k emisi fluorescence. B. Působením exonukleázové aktivity polymerázy dochází k rozštěpení próby navázané k cílové sekvenci a následnému uvolnění fluorescenčního signálu.

(real-time PCR). Oproti tradiční PCR, kdy konečný produkt (amplikon) je detekován až po ukončení reakce, PCR v reálném čase umožňuje stanovit tvorbu produktu v průběhu reakce, a to i v raných fázích, kdy přírůstek intenzity fluorescence je úměrný množství stanoveného templátu (obr. 1B). Právě měření kinetiky v brzkých fázích reakce představuje zásadní výhodu v porovnání s tradiční PCR. Postup tradiční PCR včetně jejího vyhodnocení je v porovnání s kvantitativní PCR časově náročnější a vyznačuje se nižší citlivostí detekce, amplifikované produkty jsou rozlišovány především na základě velikosti, a poskytují tak výsledky především kvalitativního charakteru. V případě qPCR je však potřeba počítat s podstatně vyšší pořizovací hodnotou přístrojového vybavení a vyššími náklady na analýzu vzorku.

Obecně lze průběh qPCR reakce rozdělit do tří fází. V první, tzv. exponenciální fázi, je reakce vysoce specifická, v případě 100% efektivity dochází k přesnému zdvojnásobení množství očekávaného produktu, data jsou tudíž maximálně přesná. Druhou fází označujeme jako lineární. Tato fáze může být poměrně variabilní, dochází při ní ke zpomalování reakce, spotřebě jednotlivých komponent reakce, může začít docházet i k degradaci vzniklých produktů. Ve třetí, tzv. plateau fázi, je reakce zastavena, nedochází k syntéze dalšího produktu, naopak může nastat jeho degradace. K přesné kvantifikaci jsou

využívány sondy obvykle značené fluorescenčním barvivem. Rozlišujeme dva hlavní typy sond: 1. nespecifické – typickým příkladem jsou fluorescenční kyaninová barviva SYBR Green, která fluoreskují při vazbě do menšího žlábků dsDNA, a 2. specifické, fluorescenčně značené sondy. Specifické sondy jsou navrženy tak, aby hybridizovaly s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery v místě vymezeném protisměrně orientovanými primery. Existuje řada variant specifických sond, nejčastěji se používají tzv. hydrolyzační (TaqMan) sondy, které nesou na svém 5' konci fluorescenční značku a na 3' konci tzv. zhášec. Při hydrolyze sondy DNA-polymerázou dochází k oddělení fluorescenční značky od zhášce a následné emisi fluorescence (obr. 2).

V praxi se nejčastěji využívají dvě základní vyhodnocovací metody. První varianta je absolutní kvantifikace, tzv. metoda absolutní standardní křivky, která umožňuje zjištění přesného množství kopií templátu ve vzorku. Získáváme tak výsledek v kopiích vzhledem k celkovému množství standardu (např. plazmidové DNA). Druhá varianta je relativní kvantifikace využívající buď relativní standardní křivku, nebo se provádí tzv. komparativní C_T metoda. Přístup založený na konstrukci relativní standardní křivky umožňuje zjištění změn množství templátu mezi vzorky vzhledem k interní kontrole (tzv. kalibrátoru). Komparativní C_T metoda využívá aritmetický

vzorec ($2^{-\Delta\Delta CT}$) definující množství cílového templátu normalizovaný na základě množství endogenních referenčních sekvencí a kvantifikovaný relativně, tedy vzhledem ke kalibrátoru (jinému vzorku – obvykle kontrole).

Využití PCR v reálném čase v onkologii

PCR v reálném čase patří mezi důležité diagnostické nástroje umožňující nejen kvantitativní analýzu zaměřenou na stanovení exprese vybraných genů, ale i kvalitativní, běžně používanou při stanovení mutací či polymorfizmů. V případě kvalitativních analýz (genotypizace) se velmi často používá vysokorozlišovací analýza křivek tání tzv. HRM (high resolution melting) analýza. V principu je tato metoda založena na heteroduplexní analýze, v rámci které jsou detekovány rozdíly v teplotách tání PCR disociačních křivek. Kromě stanovení rozdílů v analyzovaných sekvencích, především přítomnosti specifických mutací, lze HRM použít i k detekci metylací. Typickým příkladem využití HRM v onkologii je diagnostika hereditárních nádorových syndromů. Patří sem např. přímé vyšetření přítomnosti mutace v genech *BRCA1*, *BRCA2* (hereditární syndrom nádoru prsu a/nebo vaječníků); *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, Lynchův syndrom); *TP53* (Li-Fraumeniho syndrom) a řada dalších. Dále se PCR v reálném čase používá i k detekci mutací vzhledem k indikaci vhodné léčby. Klasickým příkladem je vyšetření na přítomnost bodové záměny v kodonech 12 a 13 genu *KRAS*, kdy se opět používá HRM analýza nebo se využívá technologie ARMS (amplification refractory mutation system), jenž spočívá v použití alelicky, v tomto případě mutant specifických primerů specificky rozpoznávajících jednotlivé mutanty. Není-li mutace genu *KRAS* prokázána, je vhodné nasadit biologickou léčbu založenou na aplikaci rekombinantních protilátek inhibujících EGFR (epidermal growth factor receptor). Vychází se z předpokladu, že v nádorech s *wild type KRAS* je exprese *KRAS* proteinu aktivována pouze přechodně signalizací prostřednictvím EGFR, zatímco v případech mutovaného genu *KRAS* do-

chází k jeho konstitutivní aktivaci a takové nádory vykazují výrazně sníženou odpověď na EGFR inhibici.

Jedním z nejvýznamnějších farmakogenetických vyšetření v případě hematologických malignit je stanovení polymorfismu a aktivity enzymu thiopurin S-metyltransferázy (TPMT), enzymu zásadního při odbourávání thiopurinových léčiv využívaných v onkologické terapii a jako imunosupresiv. Snížená aktivita enzymu je důsledkem řady polymorfizmů v kódující oblasti genu *TPMT* a vede k nežádoucím účinkům při léčbě thiopuriny, jako jsou neurotoxicita, hepatotoxicita atd. Stanovení nejčastějších typů polymorfizmů je prováděno pomocí kvantitativní PCR a je doprovázeno stanovením aktivity TPMT v erytrocytech pomocí HPLC.

Hlavní výhoda PCR v reálném čase v porovnání s klasickou (end-point PCR) však spočívá v možnosti kvantifikovat množství výchozího templátu podle dynamiky amplifikační reakce, především tedy stanovení exprese vybraných genů. Této skutečnosti lze využít i v experimentální onkologii při sledování hladin exprese vybraných genů na úrovni mRNA za definovaných podmínek. Jedním z možných příkladů praktického využití je predikce vhodnosti nasazení fluorovaných pirimidinů při léčbě nádorů gastrointestinálního traktu, a to v rámci paliativní i adjuvantní terapie. V těchto případech je vhodné stanovit hladinu mRNA pro thymidylát syntázu (TS), thymidin fosforylázu (TP) a dihydropyrimidin dehydrogenázu (DPD), tedy enzymů účastnících se v metabolismu 5-fluorouracilu (5-FU). mRNA může být izolována z biopsií primárního nádoru i metastázy pacienta. V případě zvýšené hladiny exprese genů lze předpokládat rezistenci nádoru k fluoropyrimidinovým cytostatikům.

Digitální PCR

Digitální PCR je někdy též označována jako tzv. třetí generace PCR (obr. 1C). Hlavní výhodou tohoto přístupu je absolutní kvantifikace, aniž musí být sestavena kalibrační křivka. V podstatě se jedná o „upgrade“ tradiční PCR umožňující klonální amplifikaci a přímou kvantifikaci nukleových kyselin. Je třeba si však uvědomit, že se nejedná o metodu zcela

nahrazující stávající PCR přístupy, ale spíše o komplementární metodu zaměřenou především na detekci vzácněji se vyskytujících cílových molekul.

Podstata digitální PCR spočívá v rozdělení analyzovaného vzorku, tedy i vlastních cílových sekvencí, do velkého množství dílčích vzorků. To se provádí buď pomocí miniaturních čipů, kdy je vzorek pomocí mikrokapilár rozdělen do řady malých segmentů (komůrek), nebo je ze vzorku vytvořena emulze olejových mikrokapek. Následně probíhá v každé mikrokapce či komůrce čipu standardní PCR, takže v závislosti na počtu mikrokapek/kapacitě čipu získáváme tisíce až několik desítek tisíc parciálních kvalitativních výsledků na bázi fluorescence (pozitivní/negativní) pro analyzovaný vzorek. Vzhledem k možné přítomnosti dvou a více cílových molekul současně (v jedné mikrokapce/segmentu čipu) je v rámci celkového vyhodnocování tato skutečnost brána v potaz a výsledky jsou korigovány na základě Poissonova rozdělení. Na rozdíl od tradiční PCR, kdy množství amplifikovaného produktu pouze přibližně odpovídá množství templátu a je značně ovlivněno počtem PCR cyklů, kvantifikace cílové sekvence v případě digitální PCR prakticky nezávisí na počtu amplifikačních cyklů, což významně eliminuje závislost na exponenciálním nárůstu množství výsledného PCR produktu, jako je tomu u konvenční PCR či PCR v reálném čase, a umožňuje tak zcela absolutní kvantifikaci (obr. 1D).

Mezi nejvýznamnější aplikace digitální PCR patří:

1. Detekce amplifikací genů spojených s maligní transformací. Genomové amplifikace jsou běžnou součástí genomu nádorových buněk. Tyto amplifikace často vedou ke zvýšené expresi specifických onkogenů a zásadním způsobem ovlivňují biologii nádoru. Přesná a citlivá detekce amplifikací je proto žádoucí v rámci diagnostiky nádorů a může mít prognostický a/nebo prediktivní význam. Tento přístup by mohl v budoucnu sloužit i jako alternativa k v současnosti prováděným FISH analýzám. Hlavní výhodou digitální PCR je robustnost, senzitivita a finanční nenáročnost v porovnání se standardně prováděnými FISH stanoveními.

Tab. 1. Přehled PCR přístupů.

	Tradiční PCR	PCR v reálném čase	Digitální PCR
celkový stručný přehled	stanoví celkové množství výsledného produktu (detekce probíhá až v tzv. fázi plateau, což může způsobovat značnou variabilitu výsledků)	stanoví množství vzniklého produktu v exponenciální fázi, což umožňuje přesnou kvantifikaci	kvantifikuje počet pozitivních a negativních frakcí daného vzorku, čímž umožňuje stanovení absolutního počtu kopií
výsledek	semikvantitativní	kvantitativní	kvantitativní
výhody a nevýhody	relativně nízké náklady × pracný způsob detekce výsledného produktu, nízká rozlišovací schopnost, dynamická škála < 2 log, diskriminace pouze na základě velikosti PCR produktu	širší dynamická škála, schopnost rozlišit méně jak dvojnásobný rozdíl, nárůst fluorescece je přímo úměrný množství vznikajících PCR ampliconů, rozštěpené sondy generují permanentní signál × nákladnější instrumentace i cena vlastního stanovení	bez nutnosti použít standardy, přímá úměra mezi počtem replikátů a přesností celkové kvantifikace, vhodná k analýze komplexních vzorků, stanovení počtu kopií v lineárním módu umožňuje detekci i nepatrných rozdílů × nákladnější instrumentace i cena vlastního stanovení
klíčové aplikace	PCR produkt vhodný pro klonování, genotypizaci, sekvencování, detekci patogenů atd.	kvantifikace genové exprese, detekce SNP, analýza miRNA, stanovení počtu kopií studovaného genu a další	absolutní kvantifikace NGS knihoven, detekce vzácných alel, absolutní kvantifikace standardů, absolutní kvantifikace virionů apod.

- Detekce alterací nukleových kyselin přítomných ve vzorku s nízkou četností, tedy minoritně zastoupených v analyzovaném vzorku. Stanovení přítomnosti mutací v homogenních vzorcích je obecně snadno proveditelné a velmi dobře realizovatelné běžnými metodami, neboť se pracuje s velkým množstvím genetického materiálu a mutace je obvykle přítomna v 50 % všech cílových sekvencí (1 mutovaná alela ze 2). Situace se však komplikuje v případě zpracování heterogenního vzorku, v němž je přítomnost mutovaných sekvencí významně snižena. V onkologii jsou typickým příkladem punkční biopsie obecně obsahující velké množství normální/zdravé tkáně nebo krevní vzorky, kde jsou aberantní buňky značně naředěny.
- Stanovení hladiny miRNA. Tento přístup umožňuje absolutní kvantifikaci miRNA a prokazuje vynikající reprodukovatelnost i v případě nízkých hladin miRNA. Digitální PCR je tedy ideální pro detekci cirkulujících miRNA jako potenciálních diagnostických biomarkerů poukazujících na přítomnost onkologického onemocnění.
- Mezi další aplikace, pro něž je vhodné uvažovat o použití digitální PCR, patří

absolutní kvantifikace patogenů, detekce onkogenních alel ve vzorcích uchovávaných ve formě parafinových bloků, absolutní kvantifikace standardů pro další aplikace, kvantifikace vzorků v rámci jejich přípravy pro NGS (nová generace sekvencování; pro více informací viz článek Koubková et al v rámci tohoto Supplementa, str. 61–68) či validace výsledků NGS díky absolutní kvantifikaci.

Závěr

Polymerázová řetězová reakce se řadí mezi základní metody molekulární biologie a v dnešní době představuje nepostradatelný nástroj pro manipulaci s genetickou informací v mnoha oblastech biomedicínského výzkumu. S objevem PCR také došlo k obrovskému rozvoji molekulární diagnostiky, který byl ještě umocněn možností kvantifikace cílových molekul díky PCR v reálném čase a následně pak vývojem digitální PCR. Přehled jednotlivých PCR přístupů, jejich porovnání včetně výhod a nedostatků je pro větší přehlednost a srozumitelnost shrnut do tab. 1.

Literatura

- Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* 1969; 98(1): 289–297.

- Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2003; 226: 3–6.
- Wade N. Researchers claim embryonic cell mix of human and cow. *N Y Times Web* 1998; A1, A26.
- Foretova L, Petrakova K, Palacova M et al. Genetic testing and prevention of hereditary cancer at the MMCI – over 10 years of experience. *Klin Onkol* 2010; 23(6): 388–400.
- Goydos JS, Reintgen DS. A molecular technique useful in the detection of occult metastases in patients with melanoma: rt-PCR analysis of sentinel lymph nodes and peripheral blood. *Methods Mol Med* 2001; 61: 301–320. doi: 10.1385/1-59259-145-0:301.
- Haferlach T, Bacher U, Kern W et al. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. *Ann Hematol* 2008; 87(1): 1–10.
- Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. *Cancer* 2008; 112(10): 2112–2118. doi: 10.1002/cncr.23427.
- Klouche M, Schroder U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(7): 888–908. doi: 10.1515/CCLM.2008.157.
- Tsalik EL, Jones D, Nicholson B et al. Multiplex PCR to diagnose bloodstream infections in patients admitted from the emergency department with sepsis. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1): 26–33. doi: 10.1128/JCM.01447-09.
- Dubská L, Vyskocilova M, Minarikova D et al. Light-Cycler SeptiFast technology in patients with solid malignancies: clinical utility for rapid etiologic diagnosis of sepsis. *Crit Care* 2012; 16(1): 404. doi: 10.1186/cc10595.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10): 986–994.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J et al. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(12): e103.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'–3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*

- DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(16): 7276–7280.
14. Wilke K, Duman B, Horst J. Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by real-time PCR. *Hum Mutat* 2000; 16(5): 431–436.
15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25(4): 402–408.
16. Krypuy M, Ahmed AA, Etemadmoghadam D et al. High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5–8. *BMC Cancer* 2007; 7: 168.
17. Rouleau E, Lefol C, Bourdon V et al. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(6): 867–875.
18. Takano EA, Mitchell G, Fox SB et al. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. *BMC Cancer* 2008; 8: 59. doi: 10.1186/1471-2407-8-59.
19. Bando H, Yoshino T, Tsuchihara K et al. KRAS mutations detected by the amplification refractory mutation system-scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *Br J Cancer* 2011; 105(3): 403–406.
20. Franklin WA, Haney J, Sugita M et al. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *J Mol Diagn* 2010; 12(1): 43–50. doi: 10.2353/jmoldx.2010.080131.
21. Demlova R, Mrkvicova M, Sterba J et al. Augmenting clinical interpretability of thiopurine methyltransferase laboratory evaluation. *Oncology* 2014; 86(3): 152–158.
22. Aschele C, Lonardi S, Monfardini S. Thymidylate Synthase expression as a predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2002; 28(1): 27–47.
23. Mader RM, Muller M, Steger GG. Resistance to 5-fluorouracil. *Gen Pharmacol* 1998; 31(5): 661–666.
24. Zimmermann BG, Grill S, Holzgreve W et al. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenat Diagn* 2008; 28(12): 1087–1093. doi: 10.1002/pd.2150.
25. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods* 2013; 10(10): 1003–1005. doi: 10.1038/nmeth.2633.
26. Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R et al. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(11): 4255–4260.
27. Henrich TJ, Gallien S, Li JZ et al. Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR. *J Virol Methods* 2012; 186(1–2): 68–72. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.08.019.
28. Nadauld L, Regan JF, Miotke L et al. Quantitative and sensitive detection of cancer genome amplifications from formalin fixed paraffin embedded tumors with droplet digital PCR. *Transl Med (Sunnyvale)* 2012; 2(2): pii: 1000107.

Metody pro studium protein-proteinových a protein-ligandových interakcí

Methods for Analysis of Protein-protein and Protein-ligand Interactions

Řurech M., Trčka F., Vojtěšek B., Müller P.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

K udržování buněčné homeostázy je nutné, aby buněčné proteiny vytvářely složité a dynamické molekulární komplexy. Proto je i vysvětlení základních fyziologických procesů na molekulární úrovni založeno na studiu protein-proteinových interakcí. Nejdříve probíhá kvalitativní analýza proteinových komplexů. Následně jsou identifikované proteinové interakce kvantifikovány po biochemické stránce. Detailní informace o strukturní podstatě daných protein-proteinových interakcí pak mohou být získány pomocí krystalografických metod. Náhled do uspořádání proteinových komplexů na molekulární úrovni umožňuje racionálně navrhovat nové syntetické látky, které cíleně ovlivňují proteinové interakce a tím i nejrůznější fyziologické nebo patologické procesy. Tato souhrnná práce je zaměřena na popis nejčastěji používaných metod pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení proteinových interakcí. Metody koimunoprecipitace (Co-IP) a afinitní koprecipitace je možné využít jako prvotní nástroj pro identifikaci interakčních partnerů studovaného proteinu. Detailní biochemická analýza mezimolekulární interakce pak vyžaduje definování kinetických a termodynamických parametrů. Pro studium afinity dvou interakčních partnerů a kinetiky reakce je možné použít metodu rezonance povrchového plazmonu (surface plasmon resonance – SPR), pro studium afinity a inhibičního potenciálu inhibitorů metodu fluorescenční polarizace (FP) a pro detailní popis afinity a termodynamických parametrů interakce (ΔG , ΔH a ΔS) metodu izotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry – ITC). Výzkum proteinových interakcí na molekulární úrovni je nejen významný pro základní výzkum, ale přináší i nové metodické přístupy, které otvírají další možnosti při racionálním navrhování nových terapeutických látek.

Klíčová slova

mapy interakcí proteinů – koimunoprecipitace – afinitní koprecipitace – rezonance povrchového plazmonu – fluorescenční polarizace – izotermální titrační kalorimetrie

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Petr Müller, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: muller@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 31. 1. 2014

Přijato/Accepted: 10. 3. 2014

Summary

In order to maintain cellular homeostasis, cellular proteins coexist in complex and variable molecular assemblies. Therefore, understanding of major physiological processes at molecular level is based on analysis of protein-protein interaction networks. Firstly, composition of the molecular assembly has to be qualitatively analyzed. In the next step, quantitative biochemical properties of the identified protein-protein interactions are determined. Detailed information about the protein-protein interaction interface can be obtained by crystallographic methods. Accordingly, the insight into the molecular architecture of these protein-protein complexes allows us to rationally design new synthetic compounds that specifically influence various physiological or pathological processes by targeted modulation of protein interactions. This review is focused on description of the most used methods applied in both qualitative and quantitative analysis of protein-protein interactions. Co-immunoprecipitation and affinity co-precipitation are basic methods designed for qualitative analysis of protein binding partners. Further biochemical analysis of the interaction requires definition of kinetic and thermodynamic parameters. Surface plasmon resonance (SPR) is used for description of affinity and kinetic profile of the interaction, fluorescence polarization (FP) method for fast determination of inhibition potential of inhibitors and isothermal titration calorimetry (ITC) for definition of thermodynamic parameters of the interaction (ΔG , ΔH and ΔS). Besides the importance of uncovering the molecular basis of protein interactions for basic research, the same methodological approaches open new possibilities in rational design of novel therapeutic agents.

Key words

protein interaction networks – co-immunoprecipitation – pull-down analysis – surface plasmon resonance – fluorescence polarization – isothermal titration calorimetry

Úvod

Základním zprostředkovatelem buněčných mezimolekulárních interakcí jsou proteiny. Schopnost proteinů vázat pevně a s vysokou specifitou ostatní molekuly jim umožňuje plnit široké spektrum funkcí. Enzymy katalyzují chemické reakce účastníci se metabolismu, replikace, opravy a transkripce DNA. Obdivuhodná je schopnost protonových pump (H^+ -ATPáz) vytvářet elektrochemický gradient na plazmatické membráně translokací protonů přes membránu [1]. Některé enzymy kovalentně modifikují jiné proteiny přidáním nebo odebráním funkční skupiny. Rychlost reakce katalyzované enzymem je obrovská – v některých případech dochází až k 10^{17} násobnému urychlení oproti nekatalyzované reakci (pro představivost 18 milisekund trvající reakce katalyzovaná orotát dekarboxylázou by trvala 78 milionů let bez přítomnosti enzymu) [2]. Velké množství proteinů je zapojeno také v procesech buněčné signalizace a transdukce signálu z vnějšího prostředí do nitra buňky. Transmembránové proteiny sloužící jako receptory na povrchu buněk mají schopnost selektivní interakce s extracelulárními signálními molekulami, důsledkem čehož dochází ke specifické odpovědi uvnitř buňky. Příkladem uvedené signalizace je přenos nervového signálu vyvolaný vazbou neurotransmiterů na membránové receptory neuronů. Pro buněčné rozpoznávání je důležitá vysoká specifita lek-

tinů při interakci se sacharidovými strukturami na povrchu buněk [3]. Také uvnitř buňky dochází k nespočtu interakcí receptorů s menšími biomolekulami (ligandy). Vazbu kyslíku v erytrocytech umožňuje hemoglobin, pro adaptivní imunitní odpověď je důležitá interakce protilátek s antigenem. Další velkou skupinu tvoří strukturální proteiny poskytující buňkám strukturální oporu (cytoskeletální proteiny) nebo sloužící jako molekulární motory (myozin, kinezin, dynein) zodpovědné za buněčnou motilitu jednobuněčných organismů, spermií a taky za kontrakci svalů.

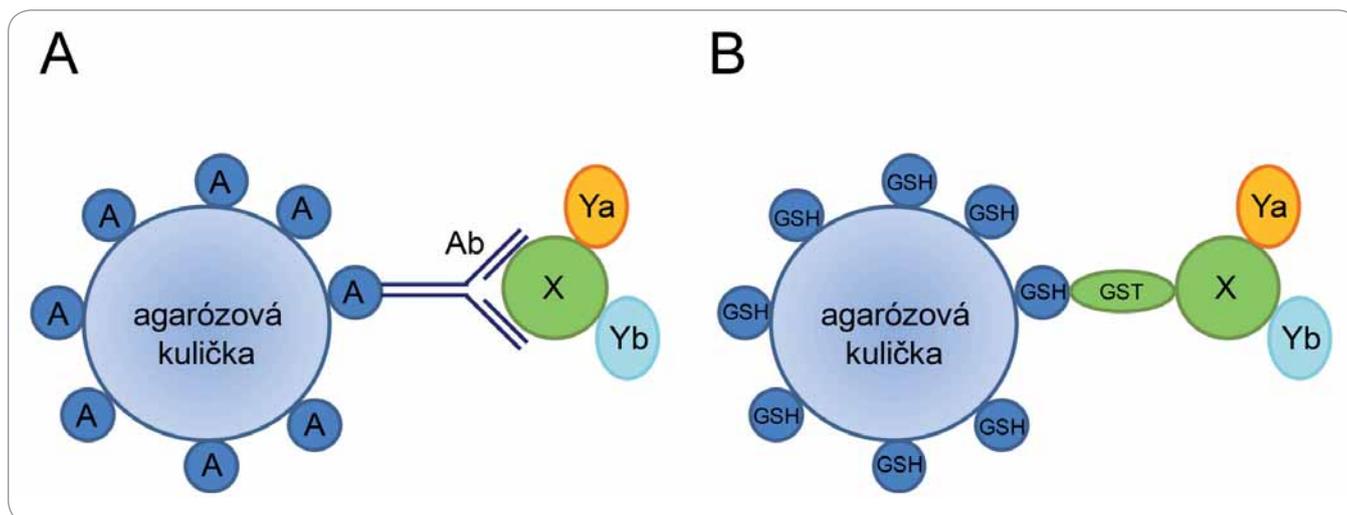
Výše uvedené příklady interakcí se označují jako protein-proteinové (PP) a protein-ligandové (PL) interakce. Počet experimentálních metod pro detekci a analýzu PP a PL interakcí je v současnosti natolik vysoký, že jejich popis by přesahoval rozsah vyhrazený pro tuto problematiku. Cílem této práce se proto stává seznámit čtenáře s několika vybranými biochemickými metodami často používanými pro studium biomolekulárních interakcí.

Koimunoprecipitace (Co-IP) a afinitní koprecipitace (pull-down analýzy)

Koimunoprecipitace a afinitní koprecipitace patří mezi kvalitativní metody pro studium PP interakcí. Principem precipitačních metod je separace specifického proteinu a jeho interakčních partnerů na pevné fázi (nosiči). Vybraný protein je

imobilizován na nosiči prostřednictvím kovalentní vazby, nebo pomocí specifických intermolekulárních interakcí (protein G – protilátka, glutation – glutation-S-transferáza, streptavidin – biotin, atd.). Základní podmínkou pro studium protein-proteinových interakcí v komplexních směsích (buněčných lysátech) je zachování nativní konformace a solubility studovaného proteinu. Z tohoto důvodu je u precipitačních metod kladen důraz na správnou volbu lyzačního pufru, jehož složení musí splňovat požadavky na zachování specifických interakcí a eliminaci nespecificky interagujících molekul. Pro správný výběr iontů je možné použít tzv. Hofmeisterovu řadu, ze které je možné vyčíst efekt různých iontů na stabilitu, agregaci a denaturaci proteinů [4].

K imunoprecipitaci studovaného proteinu a jeho interakčních partnerů jsou využívány protilátky imobilizované na pevný nosič (např. agarózovou maticí) prostřednictvím proteinů A nebo G, které váží Fc fragment protilátky (obr. 1A). K odstranění nespecificky vázaných a nenavázaných proteinů je provedeno několik promývacích kroků. Separované imunokomplexy jsou z nosiče následně uvolněny specifickou elucí, snížením pH nebo denaturačním činidlem (chaotropní látky), aby mohly být následně analyzovány. Elektroforéza a westernový přenos spojený s imunodetekcí je nejčastěji používanou metodou k detekci a kvantifikaci známých in-



Obr. 1. Princip koimunoprecipitace (A) a afinitní koprecipitace (B).

A. Protein X spolu s jeho interakčními partnery (proteiny Ya a Yb) je navázán na specifickou protilátku (Ab). Vzniklý imunokomplex je ze směsi vycytán pomocí agarózových kuliček s imobilizovaným proteinem A, který rozeznává Fc fragment protilátek. B. Komplex tří proteinů (X, Ya, Yb) je vycytán ze směsi pomocí silné interakce proteinu GST (fúzaného s proteinem X) a glutathionu (GSH) imobilizovaného na agarózových kuličkách.

Tab. 1. Různé systémy afinitních značek a jejich interakčních partnerů využívané pro purifikaci proteinů nebo studium protein-proteinových interakcí (afinitní koprecipitaci).

	afinitní značka	sekvence afinitní značky	imobilizovaný interakční partner
Peptidové značky	FLAG	DYKDDDDK	protilátka anti-FLAG
	HA	YPYDVPDYA	protilátka anti-HA
	oligoHis (6-10mer)	HHHHHH(HHHH)	chelát niklu nebo kobaltu
	Myc	EQKLISEEDL	protilátka anti-Myc
	SBP	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLR ARLEHHPQGQREP	streptavidin
	Avi	GLNDIFEAQKIEWHE	streptavidin
	Strep	WSHPQFEK	streptavidin
	V5	GKPIPPLLGLDST	protilátka anti-V5
Proteinové značky	GST (glutathione S-transferase)		glutathion
	MBP (manose-binding protein)		amylóza

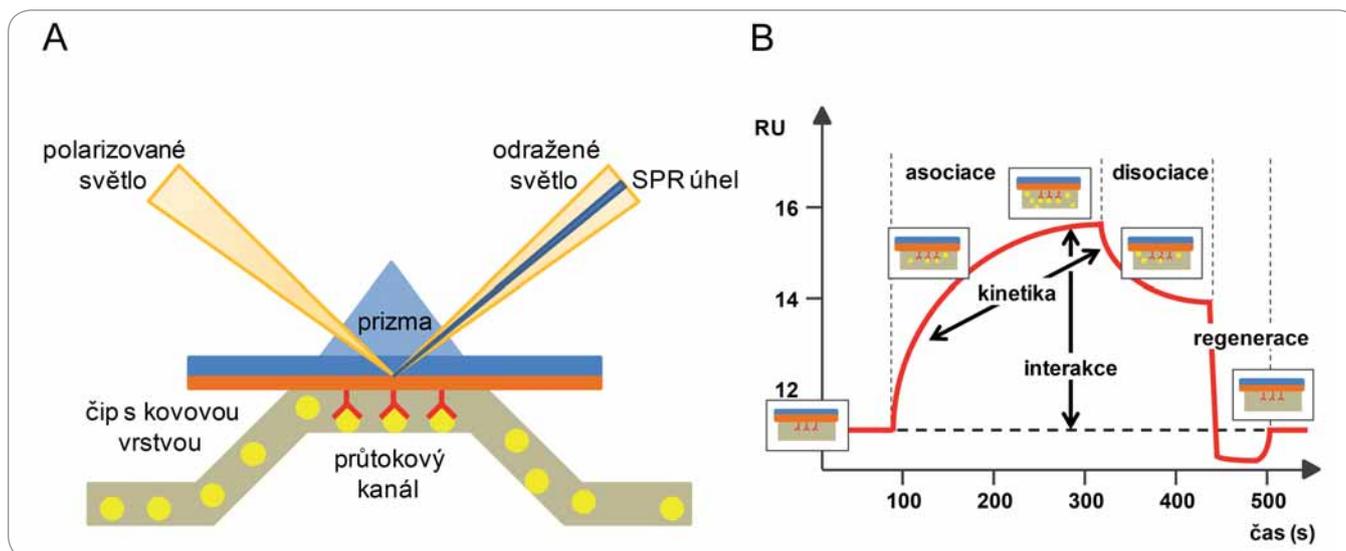
teragujících proteinů. Pro hledání dosud neznámých interakčních partnerů lze využít metody hmotnostní spektrometrie.

Afinitní koprecipitace se od koimunoprecipitace liší pouze ve způsobu zachytu proteinových komplexů na pevném povrchu (např. agarózové matrici). Namísto systému protein A/G – protilátka je analyzovaný protein vázán na povrch matrice prostřednictvím interakce krátké fúzané sekvence, tzv. afinitní značky, se specifickým ligandem imobilizovaným na povrchu matrice

(obr. 1B). Různé typy afinitních značek a jejich interakčních partnerů jsou shrnuty v tab. 1. Na rozdíl od koimunoprecipitace, kde jsme schopni analyzovat studovaný protein *in vivo* v jeho přirozené endogenní koncentraci a stavu, metoda afinitní koprecipitace vyžaduje pro studium PP interakcí klonování a přenos cizorodé rekombinantní molekuly DNA do buněk za účelem exprese proteinu fúzaného s afinitní značkou. Výhodou metody afinitní koprecipitace je ale možnost identifikovat i interakční partnery

různých nízkomolekulárních ligandů (např. kofaktorů) po jejich kovalentní modifikaci afinitní značkou.

Cílem při charakterizaci PP a PL interakcí je nejenom kvalitativní hledání interakčních partnerů, ale i porozumění strukturální podstatě interakce a kvantitativní definování jejich kinetických a termodynamických parametrů. Pro studium afinity dvou interakčních partnerů a kinetiky reakce je možné použít metodu rezonance povrchového plazmonu (surface plasmon resonance – SPR), pro



Obr. 2. Princip metody rezonance povrchového plazmonu (A) a grafický výstup SPR experimentu, sensorgram (B).

A. Jeden z interakčních partnerů je imobilizován na povrchu čipu a v roztoku proudícím kolem imobilizované molekuly je přítomen druhý interakční partner. Změna indexu lomu na povrchu čipu způsobená jejich vzájemnou interakcí je zaznamenána jako posun SPR úhlu. B. Výstup SPR experimentu zobrazuje vazbu interakčních partnerů na povrchu čipu. V prvním kroku (asociace) dochází k vazbě interakčního partnera přítomného v roztoku na partnera imobilizovaného na povrchu čipu až do stavu saturace. Následná disociace je způsobena použitím reakčního pufru. Dochází k ustálení dynamické rovnováhy interakce závislé na afinitě interakčních partnerů. Užitím regeneračního pufru ve třetím kroku je čip regenerován a připraven k dalšímu použití. Převzato ze semináře BIAcore® [10].

studium afinity a inhibičního potenciálu inhibitorů metodu fluorescenční polarizace (FP) a pro detailní popis afinity a termodynamických parametrů interakce (ΔG , ΔH a ΔS) metodu izotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry – ITC).

Rezonance povrchového plazmonu (SPR)

Metoda rezonance povrchového plazmonu (surface plasmon resonance – SPR) je založena na optickém jevu rezonance povrchového plazmonu (obr. 2A), což je oscilace hustoty náboje na rozhraní kovu a dielektrika [5]. Fotony polarizovaného světla mohou interagovat s volnými elektrony kovové vrstvy, které se následně mění na vlny povrchového plazmonu. Toto pohlcení záření vede k redukci intenzity odraženého světla. Úhel, při kterém dochází k maximální redukci intenzity odraženého světla, se označuje jako rezonanční nebo SPR úhel. Rezonanční úhel závisí na indexu lomu prostředí na povrchu čipu.

Při vlastním experimentu je jeden z interakčních partnerů imobilizován na povrchu čipu [6]. V roztoku proudícím konstantní rychlostí kolem imobilizované

molekuly je přítomen druhý interakční partner. Změna indexu lomu na povrchu čipu způsobená interakcí těchto dvou interakčních partnerů je zaznamenána jako posun rezonančního úhlu vyjádřený v tzv. rezonančních jednotkách (resonance units – RU). Kontinuální záznam změny RU jako funkce času se nazývá sensorgram a na jeho průběhu lze sledovat asociační a disociační fázi interakce (obr. 2B). Z průběhu asociační fáze lze vypočítat rychlostní konstantu asociace k_a , naopak z průběhu fáze disociační rychlostní konstantu disociace k_d . Poměr k_a/k_d pak definuje rovnovážnou disociační konstantu K_D . Metodou SPR je proto možné měřit afinitu [7] i kinetiku interakce [8] v reálném čase. Ve speciálních případech byla tato metoda dokonce využita i pro měření termodynamických parametrů interakce [9].

Fluorescenční polarizace (FP)

Předpokladem pro měření parametrů interakce pomocí FP je označení jednoho z interakčních partnerů fluorescenční značkou (fluoroforem). Molekula fluoroforu je ozářena lineárně polarizovaným světlem (obr. 3A), čímž dojde k její exci-

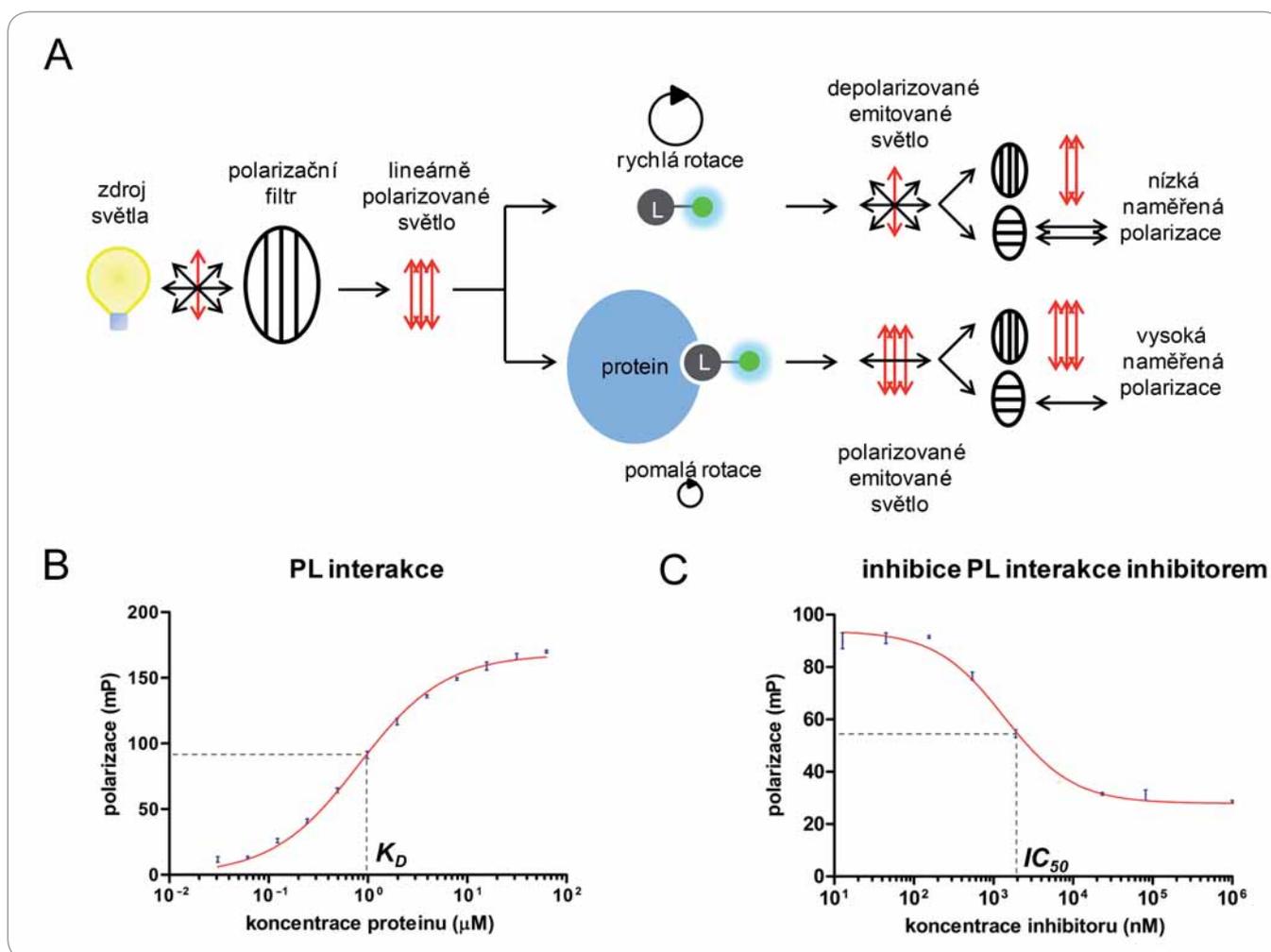
taci a následné emisi zčásti depolarizovaného světla [11]. Depolarizace světla je způsobena enormní rotací fluoroforu v čase mezi excitací a emisí. Obecně platí, že stupeň polarizace fluorescence je nepřímo úměrný rotaci fluoroforu v roztoku [12]. Při interakci dvou interakčních partnerů, ze kterých je jeden označen fluoroforem, dochází v důsledku větší velikosti komplexu (V) ke zpomalení rotace fluoroforu a následně ke zvýšení hodnoty polarizace emitovaného světla podle vztahu:

$$\text{hodnota polarizace} \propto \frac{\eta V}{RT},$$

kde η je viskozita, V je velikost komplexu s navázaným fluoroforem, R je univerzální plynová konstanta a T je absolutní teplota. Kvantitativně je hodnota polarizace emitovaného světla získána měřením intenzity emitovaného světla ve dvou na sebe kolmých rovinách a vypočítána podle následující rovnice:

$$\text{hodnota polarizace (P)} = \frac{I - I_{\perp}}{I + I_{\perp}},$$

kde I je intenzita emitovaného světla v rovině rovnoběžné s rovinou excitačního světla a I_{\perp} je intenzita emitovaného



Obr. 3. Princip metody fluorescenční polarizace (A), měření interakce proteinu s ligandem (B) a inhibice interakce proteinu s ligandem (C) metodou FP.

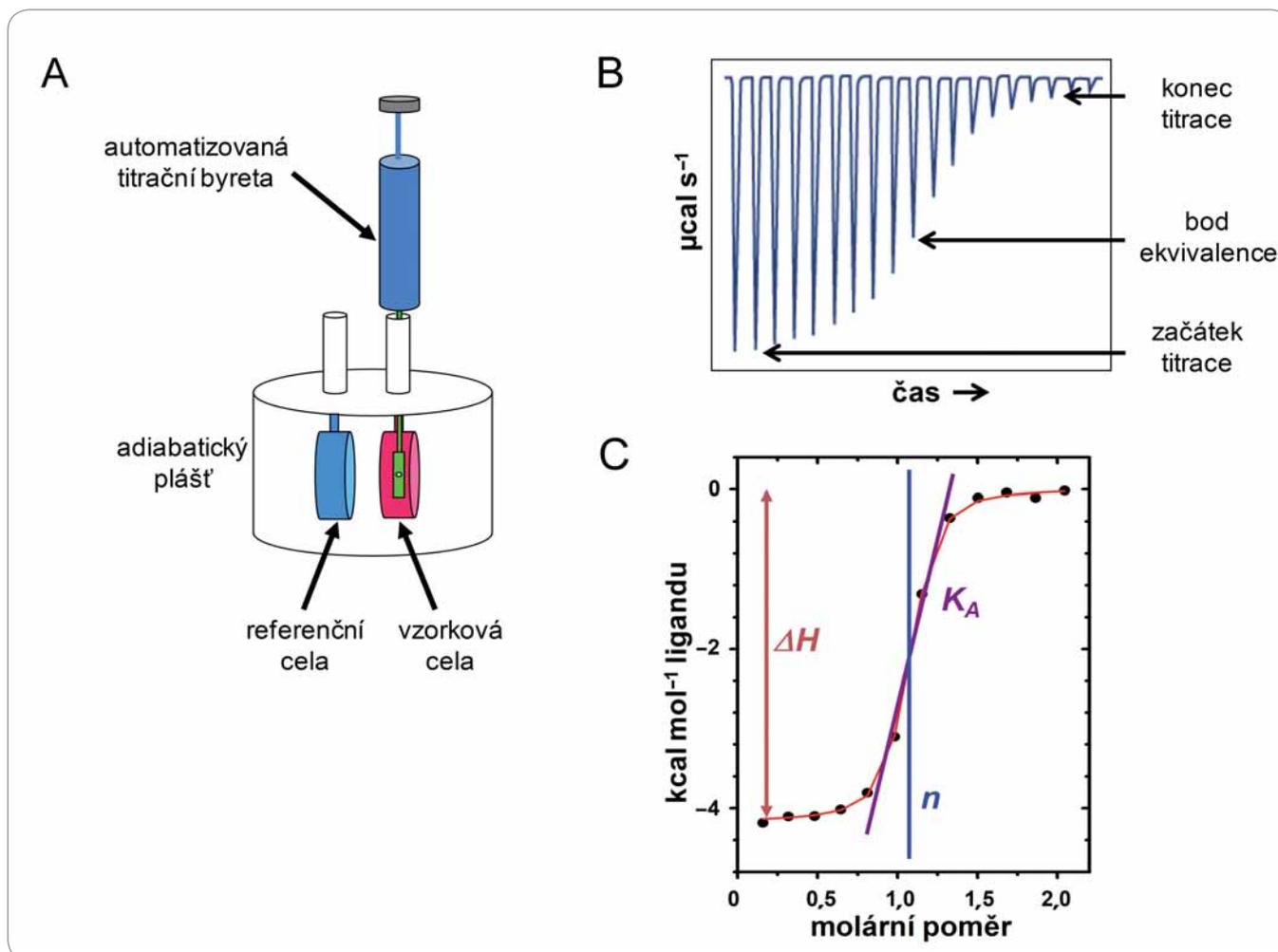
A. Fluoroforem značený ligand (L) je ozářen lineárně polarizovaným světlem. V důsledku jeho vysoké rotace dochází k emisi depolarizovaného světla a k naměření nízké hodnoty fluorescenční polarizace. Interakce ligandu s větší molekulou (proteinem) způsobí zpomalení jeho rotace a emisi polarizovaného světla. Převzato z [13]. B. Titrace fluoroforem značeného ligandu o konstantní koncentraci vzrůstající koncentrací proteinu. C. Měření IC_{50} inhibitoru protein-ligandové interakce. Směs proteinu a fluoroforem značeného ligandu byla titrována vzrůstající koncentrací inhibitoru.

světla v rovině kolmé na rovinu excitačního světla.

V praxi je možné metodu FP využít pro měření afinity dvou interakčních partnerů [14], nebo také inhibičního potenciálu různých inhibitorů [15,16]. Na rozdíl od metody SPR umožňuje FP měřit interakci bez nutnosti imobilizace, proto získaná hodnota K_D je vypočítaná ze skutečných koncentrací interakčních partnerů v roztoku. Na druhé straně měření FP vyžaduje značení interakčního partnera molekulou fluoroforu, která může ovlivnit hodnotu K_D interakce. Měření FP většinou probíhá na 96- nebo 384-jamkových deskách. Při měření disociační konstanty

K_D je interakční partner značený fluoroforem titrován vzrůstající koncentrací druhého interakčního partnera. Z výsledné křivky se odečítá hodnota K_D , která odpovídá hodnotě koncentrace neznámého interakčního partnera v inflexním bodu titrační křivky (obr. 3B). Po definování disociační konstanty interakce dvou interakčních partnerů je možné studovat také zapojení třetího interakčního partnera (např. inhibitoru), který kompetuje (soupeří) o vazbu a vytěsňuje jednoho z interakčních partnerů. V praxi se pak fluoroforem značený ligand smíchá s proteinem o konstantní koncentraci a titruje se vzrůstající koncentrací

inhibitoru. Z hodnoty koncentrace inhibitoru v inflexním bodu titrační křivky lze odečíst hodnotu IC_{50} , která odpovídá koncentraci inhibitoru schopné inhibovat 50 % vazby daného ligandu na protein (obr. 3C). Hodnota IC_{50} závisí na koncentraci proteinu a fluoroforem značeného ligandu použitého pro měření FP a taky na K_D jejich interakce [17]. Proto není možné porovnat hodnoty IC_{50} pro stejný inhibitor získané při jiných experimentálních podmínkách. Hodnota IC_{50} se tedy převádí na hodnotu inhibiční konstanty K_i , kterou lze jednoznačně definovat inhibiční potenciál inhibitoru nezávisle na podmínkách měření FP.



Obr. 4. Schematické znázornění přístroje MicroCal® (A).

Teplo uvolněné při interakci dvou interakčních partnerů je zaznamenáno jako funkce času (B) a po integraci jako závislost entalpie na molárním poměru interakčních partnerů (C). Z výsledního grafu je možné přímo definovat hodnoty změny entalpie, asociační konstantu i stechiometrii interakce. Převzato z manuálu GE Healthcare [23].

Propočet IC_{50} na K_i řeší různé formy Cheng-Prusoffovy rovnice [18,19]. V současné době je možné pro propočet použít některou z aplikací volně dostupných na internetu [20].

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC)

Izotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry – ITC) patří mezi metody pro měření termodynamických parametrů interakce dvou interakčních partnerů. Tato metoda vychází z pozorování, že při interakci dvou látek dochází k absorpci nebo k uvolnění tepla [21]. Měřením tohoto tepla je pak možné přesně určit vazebnou konstantu (K_D), stechiometrii interakce (n), entalpii (ΔH) a entropický příspěvek ($-T\Delta S$) a de-

finovat tak kompletní termodynamický profil interakce bez nutnosti značení.

Kalorimetry používané pro analýzu biomolekul obsahují dvě identické cely, v jedné probíhá interakce (vzorková cela) a druhá slouží jako referenční cela [22]. Obě cely jsou umístěny v adiabatickém plášti a temperovány na stejnou teplotu (obr. 4A). Zkoumaná molekula je pomocí injektoru postupně dávkována do cely se vzorkem za současného měření tepelného rozdílu oproti referenční cele.

V případě, že pozorovaná reakce je exotermická (teplo se uvolňuje), bude potřebné dodat vzorkové cele méně tepla k udržení tepelné rovnováhy s referenční celou. Tato změna tepla je měřena a zaznamenána v grafu jako funkce času (obr. 4B) a po integraci jako závis-

lost entalpie na molárním poměru mezi interakčními partnery (obr. 4C). Z grafu na obr. 4C je možné přímo určit hodnotu asociační konstanty (K_A), entalpie (ΔH) a stechiometrii interakce (n). Pokud během interakce nedochází k jiným entalpickým změnám, lze celkovou změnu volné energie interakce (ΔG) a entropický příspěvek interakce ($-T\Delta S$) vyjádřit pomocí následujícího vztahu:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_A,$$

kde T je absolutní teplota a R je univerzální plynová konstanta.

Závěr

Problematika protein-proteinových a protein-ligandových interakcí se v po-

slední době těší stále většímu zájmu vědeckých skupin z nejrůznějších vědeckých oborů od informatiky až po farmakologii. K důkladnému porozumění fungování organismu jako celku i buněk samotných je totiž popis mezimolekulárních interakcí naprosto klíčový. V současnosti představují nízkomolekulární inhibitory PP a PL interakcí nejčastější strategii v boji proti nejrůznějším chorobám. Tato práce byla proto věnována metodám, kterými je možno problematiku PP a PL interakcí studovat. K hledání interakčních partnerů je možné použít metody koimmunoprecipitace nebo afinitní koprecipitace, ke studiu kinetiky interakce metodu SPR, ke studiu inhibičního potenciálu inhibitorů metodu FP a k popisu termodynamických parametrů metodu ITC. Dalším krokem studia PP a PL interakcí je přímý náhled do atomární struktury (např. metodami rentgenové difrakce nebo NMR spektroskopie). Poznání atomární podstaty interakce nám dává možnost porozumět této interakci na úrovni fyzikálních sil, které jsou za interakci odpovědné a přenést tak studium interakcí z úrovně experimentální do úrovně teoretické. Toho se pak využívá při sestavování algoritmů pro simulační programy v oboru počítačového modelování, které začíná v posledních letech nevídaný rozvoj. Virtuální screening knihovny několika milionů nízkomolekulárních látek je

často prvním krokem při hledání možných inhibitorů potenciálního terapeutického cíle (často proteinu). Experimentální a teoretické přístupy ke studiu mezimolekulárních interakcí jdou v současnosti ruku v ruce a společně napomáhají k porozumění fungování organismu i buňky jako takové.

Literatura

1. Auer M, Scarborough GA, Kuhlbrandt W. Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature* 1998; 392(6678): 840–843.
2. Radzicka A, Wolfenden R. A proficient enzyme. *Science* 1995; 267(5194): 90–93.
3. Rudiger H, Siebert HC, Solis D et al. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Curr Med Chem* 2000; 7(4): 389–416.
4. Zhang Y, Cremer PS. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr Opin Chem Biol* 2006; 10(6): 658–663.
5. Buijs J, Franklin GC. SPR-MS in functional proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2005; 4(1): 39–47.
6. Torreri P, Ceccarini M, Macioce P et al. Biomolecular interactions by surface plasmon resonance technology. *Ann Ist Super Sanita* 2005; 41(4): 437–441.
7. Myszka DG, Jonsen MD, Graves BJ. Equilibrium analysis of high affinity interactions using BIACORE. *Anal Biochem* 1998; 265(2): 326–330.
8. Morton TA, Myszka DG. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Enzymol* 1998; 295: 268–294.
9. Roos H, Karlsson R, Nilshans H et al. Thermodynamic analysis of protein interactions with biosensor technology. *J Mol Recognit* 1998; 11(1–6): 204–210.
10. Protein.iastate.edu [homepage on the Internet]. The Protein Facility of the Iowa State University Office of Biotechnology. BIACore seminar. Available from: <http://www.proteomics.iastate.edu/seminars/BIACore/index.html>.
11. Jameson DM, Crony JC. Fluorescence polarization: past, present and future. *Comb Chem High Throughput Screen* 2003; 6(3): 167–173.
12. Perrin F. Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité. *J Phys* 1926; 7(12): 390–401.
13. Hi-techsci.com [homepage on the Internet]. Homepage of TgK Scientific Ltd. Available from: <http://www.hi-techsci.com/techniques/anisotropy/>.
14. Williamson DS, Borgognoni J, Clay A et al. Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design. *J Med Chem* 2009; 52(6): 1510–1513. doi: 10.1021/jm801627a.
15. Bolger R, Wiese TE, Ervin K et al. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* 1998; 106(9): 551–557.
16. Kim J, Felts S, Llauger L et al. Development of a fluorescence polarization assay for the molecular chaperone Hsp90. *J Biomol Screen* 2004; 9(5): 375–381.
17. Cer RZ, Mudunuri U, Stephens R et al. IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(web server issue): W441–W445. doi: 10.1093/nar/gkp253.
18. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22(23): 3099–3108.
19. Munson PJ, Rodbard D. An exact correction to the „cheng-prusoff” correction. *J Recept Res* 1988; 8(1–4): 533–546.
20. Sw16.im.med.umich.edu [homepage on the Internet]. Homepage of professor Shaomeng Wang. University of Michigan. Available from: http://sw16.im.med.umich.edu/software/calc_ki/.
21. Wiseman T, Williston S, Brandts JF et al. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 1989; 179(1): 131–137.
22. Freyer MW, Lewis EA. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol* 2008; 84: 79–113.
23. Milev S. Isothermal titration calorimetry: Principles and experimental design. GE Healthcare manual. Available from: http://bcmp.med.harvard.edu/sites/bcmp.med.harvard.edu/files/facilities/ITC200%20training_.pdf.pdf.

Detekce protein-proteinových interakcí metodami FRET a BRET

Detection of Protein-protein Interactions by FRET and BRET Methods

Matoulková E., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Studium protein-proteinových interakcí *in vivo* se v současné době dostává do popředí zájmu – umožňuje prokázat nebo upřesnit již známé protein-proteinové interakce a odhalit jejich inhibitory, zachytit konformační změny proteinů, objasnit nebo upřesnit signální kaskády v živé buňce s minimálním ovlivněním jejího buněčného prostředí. Jedním z možných přístupů umožňujících tuto charakteristiku jsou metody využívající rezonančního přenosu energie – fluorescenční (FRET) a jeho pozdější modifikace bioluminiscenční (BRET). Tyto metody jsou založeny na zviditelnění proteinových interakcí pomocí excitace fluorescenčních proteinů, ať už světelně nebo enzymaticky. Tyto přístupy umožňují nejen lokalizovat proteiny v buňce nebo jejich organelách (případně i v malých živočiších), ale i kvantifikovat intenzitu fluorescenčního nebo luminiscenčního signálu a odhalit pevnost vazby mezi interakčními partnery. V tomto příspěvku je objasněn princip metod FRET a BRET, jejich konkrétní aplikace při studiu protein-proteinových interakcí a jsou popsány dosavadní poznatky získané s využitím těchto metod a upřesňující některé molekulární a buněčné mechanismy a signalizace související s nádorovou biologii.

Klíčová slova

FRET – BRET – zobrazovací metody – protein-proteinové interakce *in vivo*

Summary

Nowadays, *in vivo* protein-protein interaction studies have become preferable detecting methods that enable to show or specify (already known) protein interactions and discover their inhibitors. They also facilitate detection of protein conformational changes and discovery or specification of signaling pathways in living cells. One group of *in vivo* methods enabling these findings is based on fluorescent resonance energy transfer (FRET) and its bioluminescent modification (BRET). They are based on visualization of protein-protein interactions via light or enzymatic excitation of fluorescent or bioluminescent proteins. These methods allow not only protein localization within the cell or its organelles (or small animals) but they also allow us to quantify fluorescent signals and to discover weak or strong interaction partners. In this review, we explain the principles of FRET and BRET, their applications in the characterization of protein-protein interactions and we describe several findings using these two methods that clarify molecular and cellular mechanisms and signals related to cancer biology.

Key words

FRET – BRET – imaging methods – protein-protein interaction *in vivo*

Práce byla podpořena granty GA ČR P206/12/G151 a GA ČR 13-00956S, Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, Z.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the Czech Science Foundation projects P206/12/G151 and 13-00956S, by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Eva Matoulková
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: eva.matoulkova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 20. 1. 2014

Přijato/Accepted: 31. 3. 2014

Úvod

Od objevení primární struktury zeleného fluorescenčního proteinu (green fluorescent protein – GFP) v roce 1992 [1] se v posledních 20 letech fluorescenční proteiny a jejich různorodé aplikace stávají nepostradatelnými při zkoumání a popisování molekulárních buněčných dějů, buněčné fyziologie, buněčných interakcí a signalizací v živých buňkách a v malých organizmech. Významný potenciál fluorescenčních proteinů ve srovnání s fluorescenčními značkami tkví v jejich snadné manipulovatelnosti metodami genového inženýrství, která umožňuje jejich snadnou a stabilní expresi v buňkách a organizmech (příprava stabilních buněčných linií i transgenních organizmů) [2,3]. Fluorescenční proteiny je možné konjugovat nebo fúzovat s nejrůznějšími biomolekulami a je tak možné studovat různé typy vazeb – od protein-proteinových interakcí (antigen-protilátka, ligand-receptor), přes DNA nebo RNA hybridizaci až po vazby proteinu s DNA anebo RNA [4]. Právě ex-

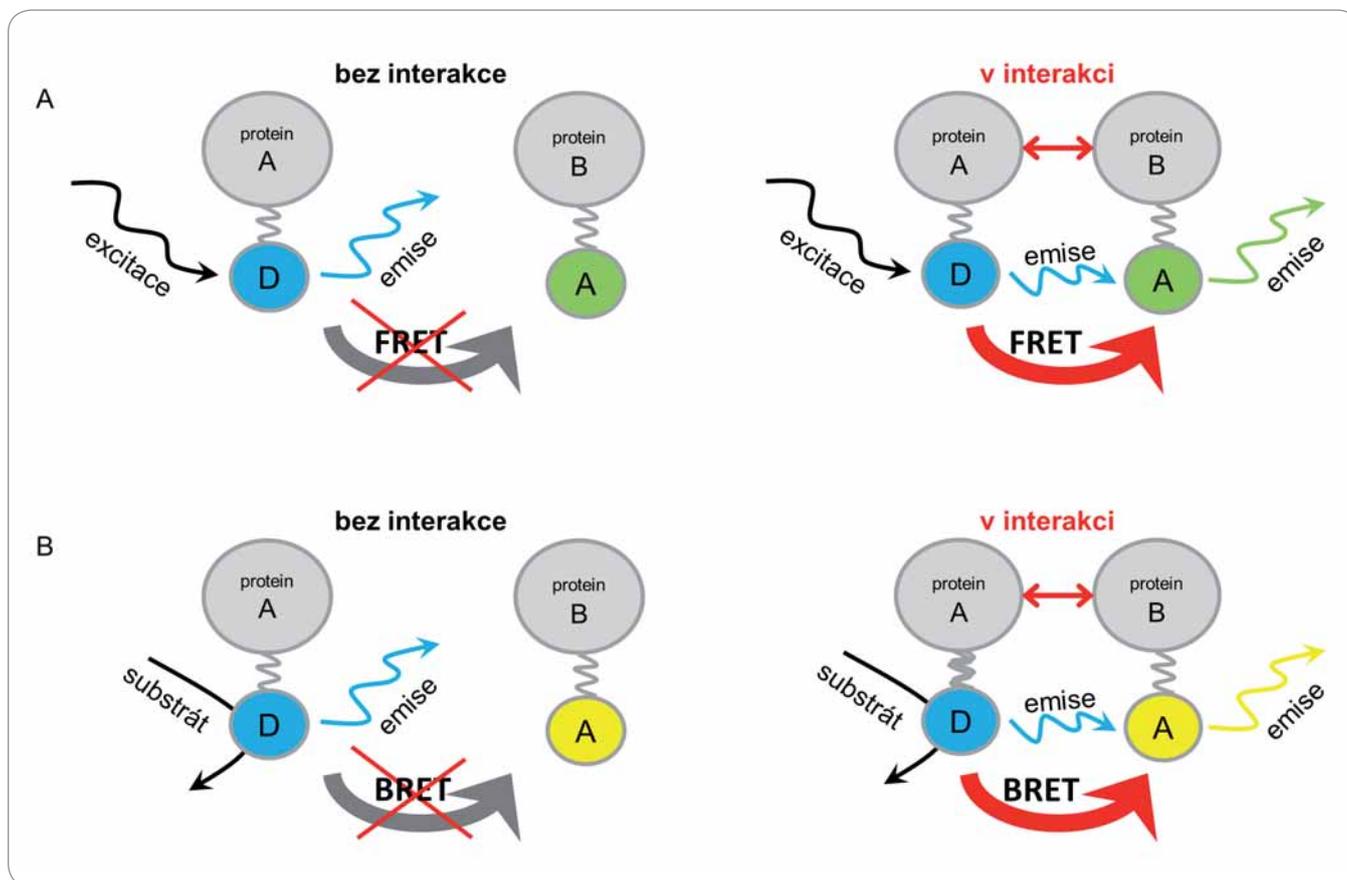
prese fluorescenčních proteinů samotnou buňkou umožňuje sledovat jednotlivé interakce v intaktním buněčném prostředí a reálně tak hodnotit celkový vliv chemických sloučenin (např. léčiv) na živou buňku či organizmus. V současnosti je tento „*in vivo*“ trend stále častěji využíván farmaceutickými firmami při charakterizaci nových sloučenin s potenciálním terapeutickým účinkem.

Fluorescenční (Försterův) rezonanční přenos energie

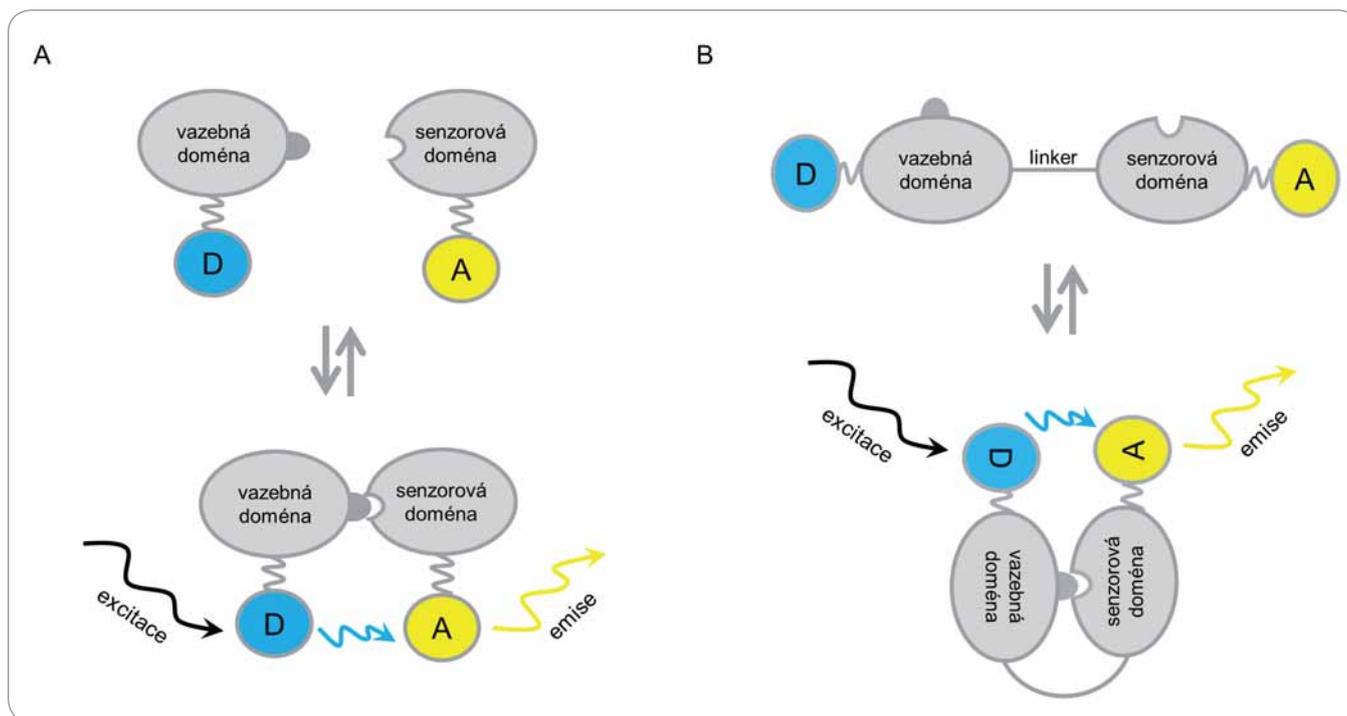
Základní a poprvé popsanou metodou využívající fluorescenční proteiny v živých buňkách je fluorescenční (Försterův) rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer – FRET) (obr. 1A). Metoda je založena na přenosu energie mezi dvěma sousedícími fluorescenčními molekulami (fluorofory) – z donoru na akceptor. Fluorofory se liší rozmezím vlnových délek svých emisních a excitačních spekter. Po excitaci donorové molekuly (externím zdrojem monochromatického světla

o příslušné vlnové délce) dochází k emisi světla o vlnové délce charakteristické pro daný fluorofor. Takto uvolněná energie ve formě světla je zachycena akceptorovou molekulou a dochází tak k její excitaci a následně i k emisi světla o vlnové délce charakteristické pro akceptorovou molekulu. Světlo emitované akceptorem je finálně zachyceno a jeho intenzita je měřena detektorem, případně jej lze pozorovat mikroskopicky za využití příslušného světelného filtru [5].

Pro přenos energie mezi dvěma fluorofory je vždy nezbytné dodržet dvě základní podmínky – donor a akceptor musí být v dostatečné vzdálenosti (1–10 nm) a musí docházet k částečnému překryvu emisního (donorového) a excitačního (akceptorového) spektra (nejméně z 30 %) [6]. Vzájemná využitelnost a kombinovatelnost jednotlivých fluoroforů je tedy vzhledem k jejich rozdílným emisním a excitačním spektrům omezená. Nejčastěji využívané donorové a akceptorové dvojice fluorescenčních molekul jsou: 1. modrý fluorescenční



Obr. 1. Znázornění mechanismu rezonančního přenosu energie (proteinů v interakci a bez interakce).



Obr. 2. Dva typy biosenzorů: intermolekulární (A) a intramolekulární (B) a schéma jejich přenosu energie.

protein (cyan fluorescent protein – CFP) a žlutý fluorescenční protein (yellow fluorescent protein – YFP), 2. FITC a rhodamin, 3. CFP a červený fluorescenční protein DsRed, 4. modrý fluorescenční protein (blue fluorescent protein – BFP) a GFP, 5. Alexa488 a Cyanin 3 (Cy3), 6. GFP (nebo YFP) a DsRed, 7. Cy3 a Cyanin 5 (Cy5), 8. Alexa488 a Alexa555 [4].

Metodami genového inženýrství je možné jednotlivé fluorofory konjugovat s cílovými proteiny (případně s konkrétními vazebnými doménami) a navrhnout i vytvořit tzv. biosenzory umožňující studovat jednotlivé interakce a vazebné schopnosti těchto proteinů. Rozlišují se biosenzory dvojího typu: 1. intermolekulární (bimolekulární) a 2. intramolekulární (unimolekulární) [7].

Intermolekulární biosenzory jsou tvořeny dvěma molekulami – donorovou a akceptorovou molekulou, které jsou spojeny s vazebnou (donorovou) nebo sensorovou (akceptorovou) doménou (případně proteiny) (obr. 2A). Jsou využívány především při studiu a detekci protein-proteinových interakcí v buňkách. Jejich výhodou je snadná příprava pomocí dvou plazmidů exprimujících proteiny fúzané s fluorofory, jejichž intenzita signálu je zachytitelná detektorem.

Nejsou však vhodné pro rutinní využití, protože měření a kvantifikace FRET-signálu vyžaduje citlivou a rychlou detekci fluorescenčního signálu, který rychle ztrácí svou intenzitu. Nadto dochází ke vzájemné excitaci akceptorových molekul fluoroforu, a tím vytváření falešně pozitivního signálu [6].

Druhým typem biosenzorů jsou intramolekulární biosenzory tvořené jednou molekulou sestávající z akceptorového a donorového fluoroforu navzájem propojených linkerem a konjugovaných s příslušnou vazebnou nebo sensorovou doménou (obr. 2B). Využití tohoto typu slouží ke snadší kvantifikaci v živých systémech než v případě intermolekulárních biosenzorů. Na druhou stranu je obtížnější a zdlohavější jejich návrh, příprava a následná evaluace systému [5].

Doposud bylo vyvinuto množství intramolekulárních biosenzorů sledujících koncentraci iontů v buňce, sacharidy, fosfolipidy, aktivitu proteinkináz nebo GTPas a další. Byly také navrženy a vytvořeny biosenzory sledující aktivitu onkoproteinů, např. zvýšenou aktivitu Ras v lamelipodiích po stimulaci epidermálním růstovým faktorem (epidermal growth factor – EGF), začlenění

c-Raf do plazmatické membrány a vedlejší aktivaci c-Raf po stimulaci EGF nebo zvyšující se fosforylaci CrklI (člen rodiny Crk) po stimulaci EGF [5]. S využitím biosenzorů byla rovněž potvrzena interakce estrogenového receptoru α a transkripčního faktoru Sp1 v živých buňkách. Interakce ER α /Sp1 byla prokázána při regulaci řady genů asociovaných s buněčnou proliferací a buněčným cyklem [8].

První klinicky využitelný geneticky kódovaný biosenzor byl vyvinut a využit pro detekci kinázové aktivity Bcr-Abl a s ní související citlivostí k terapeutickým inhibitorům u pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Aktivita Bcr-Abl byla sledována na základě zviditelnění fosforylace CrkL (nejcharakterističtějšího substrátu Bcr-Abl) přímo v izolovaných BMC a PBMC buňkách z krve pacientů s CML. Tyto navržené biosenzory jsou schopné rozlišit již malé populace buněk rezistentních k terapeutickým inhibitorům, a predikovat tak citlivost pacientů k terapii [9].

Nevýhodou FRET je znesnadnění interpretace výsledků vlivem vzájemné excitace akceptorových fluoroforů a samotným monochromatickým světlem excitujícím donorový fluorofor. Dále dochází k rychlému slábnutí signálu do-

Tab. 1. Přehled různých variant BRET a jejich nejčastějších donorových a akceptorových fluoroforů [2,16–20].

Metoda	Donor	Substrát	Donor λ_{emise} [nm]	Akceptor	Akceptor $\lambda_{excitace/emise}$ [nm]
BRET1	Rluc	CLZ-h	480	YFP	514/530
BRET2	Rluc Rluc8	CLZ-400a DeepBlueC	480 395	GFP	400/510
BRET3	luc Rluc8	D-Luc CLZ	565 480	DsRed Cy3, Cy3.5 mOrange	558/583 550/570 548/564
QD-BRET	Rluc Rluc8	CLZ	480	Qdot	605/655

noru a k buněčné autofluorescenci způsobené přítomností buněčných organel (mitochondrií a lysozomů) [4,10–12].

Bioluminiscenční rezonanční přenos energie

Bioluminiscenční rezonanční přenos energie (bioluminescence resonance energy transfer – BRET) je modifikací metody FRET (obr. 1B). BRET je oproti předchozí metodě zahájen enzymatickou reakcí katalyzovanou donorovou molekulou. To vede k až 10násobnému snížení nežádoucího měřeného signálu pozadí a tím umožňuje detekci až 40krát menšího množství proteinu při dosažení stejné intenzity signálu [13]. Jako donorová molekula není využíván fluorofor, a není tedy potřeba k aktivaci přenosu externí zdroj monochromatického světla. U BRET je donorovou molekulou enzym, který konvertuje specifický substrát a přitom uvolňuje světelnou energii, excitující vhodnou akceptorovou fluorescenční molekulu. Ta následně, stejně jako u FRET, emituje světlo o patřičné vlnové délce a to je finálně zachyceno detektorem [14].

Podmínky pro přenos energie jsou podobné jako u FRET – molekuly musí být v dostatečné vzdálenosti (méně než 10 nm) a emisní spektrum donoru a excitační spektrum akceptoru se musí překrývat. Pokud k interakci mezi sledovanými (fúzanými proteiny s donorem a akceptorem) molekulami nedochází, je zachycováno pouze světlo vznikající při transformaci substrátu. Interagují-li fúzané proteiny, dojde k přenosu energie z donoru na akceptor a následně

k emisi světla akceptorem. Tak je možné detekovat interakce mezi různými nebo i stejnými proteiny či strukturální a konformační změny proteinu [12].

Metoda BRET byla poprvé popsána v roce 1999 [15] a od té doby bylo vyvinuto několik jejích variant využívajících různé substráty a kombinace donoru a akceptoru. Jednotlivé modifikace jsou označovány jako BRET1, BRET2, BRET3 (v pořadí podle popisu a charakterizace) a nejnovější QD-BRET (tab. 1).

Původní popsána varianta je označována jako BRET1 [15]. Donorovou molekulou je luciferáza Rluc (pocházející ze žahavce renila fialová), substrátem pak coelenterazine h (CLZ-h) a jako akceptorová molekula je YFP nebo jeho varianty (topaz, citrine, venus, YPet) [12]. Později byla metoda pozměněna do podoby BRET2 [2], u které se místo CLZ-h využívá jeho analog CLZ-400a nebo DeepBlueC a v některých případech se používá mutovaná varianta Rluc – Rluc8. Jako akceptor jsou využívány varianty GFP (GFP2 nebo GFP10). Výhoda BRET2 oproti BRET1 je větší vzdálenost emisních rozmezí donorové a akceptorové molekuly, ovšem DeepBlueC jako substrát má asi 100–300krát sníženou excitační schopnost (což je možné částečně nahradit mutantem Rluc8, který má přibližně 30krát zvýšenou emisní aktivitu).

Další varianta BRET je BRET3 využívající substrát D-luciferin (D-Luc). Donorovou molekulou je světlouščí luciferáza (luc) nebo Rluc8 a akceptorovými molekulami pak DsRed, Cy3, Cy3.5 nebo mOrange [16–18]. Předpokládaná vý-

hoda BRET3 je nižší buněčná autofluorescence a trvalejší světelná emise světlouščí luciferázy ve srovnání s Rluc. To je ovšem limitováno extrémně nízkými emisními signály a podstatným překrytím donorového a akceptorového emisního maxima.

Nejnověji popsána a v praxi vyzkoušená modifikace je tzv. QD-BRET [19,20], využívající jako akceptorovou molekulu tzv. quantum dots. Quantum dots jsou polovodičové nanokrystaly excitovatelné v příslušných vlnových délkách. Vlnová délka jimi emitovaného světla pak závisí na jejich průměru a jsou tak schopny pokrýt emisní spektrum od modré až po infračervenou oblast. Nevýhoda této varianty je ovšem velikost nanokrystalů (1,5–6 nm) a fakt, že k fúzi sledované molekuly (proteinu) s nanokrystaly nemůže dojít geneticky – nanokrystaly nejsou geneticky kódované, a tak nemohou být produkovány v živých buňkách. Lze je ovšem využít pro značení cílových molekul při *in vitro* diagnostice. Velká výhoda této metody je bezesporu jasná separace donorových a akceptorových emisních spekter [12].

V dnešní době je BRET považována za jednu z nejuniverzálnějších metod pro studium protein-proteinových interakcí v živých buňkách. Abnormální funkce (hyperaktivace nebo inhibice) proteinů je často pozorována u různých závažných onemocnění (např. nádorová nebo neurodegenerativní onemocnění). Řada studií tuto metodu využívá: 1. pro screening nových receptorových ligandů a jejich vliv na aktivitu receptoru; 2. pro sledování aktivity enzymů – proteázové, kinázové;

3. pro sledování a identifikace protein-proteinových interakcí a jejich inhibitorů nebo 4. pro popsání signálních buněčných drah [12,21–23]. Slouží tak především k identifikaci bioaktivních sloučenin ovlivňujících buněčné vlastnosti.

Závěr

Metoda FRET a její modifikace BRET jsou v současné době intenzivně se rozvíjející metody a spolu s technickým pokrokem v oblastech mikroskopického zobrazování a vysoce citlivé i přesné detekce světelného záření o různých vlnových délkách umožňují sledovat protein-proteinové interakce a konformační změny proteinů v živých buňkách nebo malých organizmech prostorově a v reálném čase s minimálním zásahem do buněčného prostředí [3]. Vzhledem k nutnosti genového inženýrství při přípravě jednotlivých FRET- nebo BRET-biosenzorů a při přípravě FRET- nebo BRET-fluoroforů fúzovaných se sledovanými proteiny je využití těchto metod v klinické praxi prozatím obtížné, i když první klinická aplikace již byla publikována [9]. Nicméně tyto přístupy studia proteinových interakcí *in vivo* začínají být hojněji využívány při sledování, testování a ověřování vlivu různých doposud necharakterizovaných chemických látek a sloučenin a jejich inhibitorů na buňku nebo živý organizmus (myši). Stejně tak začínají být tyto metody uplatňovány při sledování účinku potenciálních léčiv využitelných nejen ve farmaceutickém průmyslu [24].

Literatura

1. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111(2): 229–233.
2. Bertrand L, Parent S, Caron M et al. The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRs). *J Recept Signal Transduct Res* 2002; 22(1–4): 533–541.
3. De A, Loening AM, Gambhir SS. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res* 2007; 67(15): 7175–7183.
4. Zadrán S, Standley S, Wong K et al. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 96(4): 895–902. doi: 10.1007/s00253-012-4449-6.
5. Aoki K, Komatsu N, Hirata E et al. Stable expression of FRET biosensors: a new light in cancer research. *Cancer Sci* 2012; 103(4): 614–619. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02196.x.
6. Day RN, Davidson MW. Fluorescent proteins for FRET microscopy: monitoring protein interactions in living cells. *Bioessays* 2012; 34(5): 341–350. doi: 10.1002/bies.201100098.
7. Kiyokawa E, Hara S, Nakamura T et al. Fluorescence (Förster) resonance energy transfer imaging of oncogene activity in living cells. *Cancer Sci* 2006; 97(1): 8–15.
8. Kim K, Barhoumi R, Burghardt R et al. Analysis of estrogen receptor alpha-Sp1 interactions in breast cancer cells by fluorescence resonance energy transfer. *Mol Endocrinol* 2005; 19(4): 843–854.
9. Mizutani T, Kondo T, Darmanin S et al. A novel FRET-based biosensor for the measurement of BCR-ABL activity and its response to drugs in living cells. *Clin Cancer Res* 2010; 16(15): 3964–3975. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0548.
10. Boute N, Jockers R, Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(8): 351–354.
11. Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction* 2006; 132(6): 829–837.
12. Bacart J, Corbel C, Jockers R et al. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J* 2008; 3(3): 311–324. doi: 10.1002/biot.200700222.
13. Arai R, Nakagawa H, Tsumoto K et al. Demonstration of a homogeneous noncompetitive immunoassay based on bioluminescence resonance energy transfer. *Anal Biochem* 2001; 289(1): 77–81.
14. Xia Z, Rao J. Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(1): 37–44. doi: 10.1016/j.copbio.2009.01.001.
15. Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(1): 151–156.
16. Arai R, Nakagawa H, Kitayama A et al. Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein. *J Biosci Bioeng* 2002; 94(4): 362–364.
17. Yamakawa Y, Ueda H, Kitayama A et al. Rapid homogeneous immunoassay of peptides based on bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase. *J Biosci Bioeng* 2002; 93(6): 537–542.
18. Loening AM, Wu AM, Gambhir SS. Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods* 2007; 4(8): 641–643.
19. De A, Ray P, Loening AM, Gambhir SS. BRET3: A red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J* 2009; 23(8): 2702–2709. doi: 10.1096/fj.08-118919.
20. Yao H, Zhang Y, Xiao F et al. Quantum dot/bioluminescence resonance energy transfer based highly sensitive detection of proteases. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007; 46(23): 4346–4349.
21. Boute N, Pernet K, Issad T. Monitoring the activation state of the insulin receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol* 2001; 60(4): 640–645.
22. Gavet O, Pines J. Progressive activation of Cyclin B1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell* 2010; 18(4): 533–543. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.013.
23. Couturier C, Deprez B. Setting up a bioluminescence resonance energy transfer high throughput screening assay to search for protein/protein interaction inhibitors in mammalian cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 100. doi: 10.3389/fendo.2012.00100.
24. Aoki K, Kamioka Y, Matsuda M. Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from in vitro to in vivo: basis of biosensor construction, live imaging, and image processing. *Dev Growth Differ* 2013; 55(4): 515–522. doi: 10.1111/dgd.12039.

Detekce proteinů, proteinových interakcí a modifikací s využitím „proximity ligation assay“ *in situ*

In Situ Proximity Ligation Assay for Detection of Proteins, Their Interactions and Modifications

Brychtová V., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Pro správné pochopení fyziologických procesů v buňce a případně jejich odchylek jsou molekulárně-biologické analýzy nezbytným nástrojem využívaným v biomedicinském výzkumu a také v klinické diagnostice. Existuje množství technik, které umožňují určit lokalizaci studovaných proteinů a jejich interakční aktivitu. Tyto přístupy využívají především interakce specificky se vázících molekul s cílovými proteiny (protilátky) nebo synteticky připravené rekombinantní proteiny (GFP fúzní protein; metody fluorescenčního/bioluminiscenčního rezonančního přenosu energie). „Proximity ligation assay“ (PLA) *in situ* představuje novou techniku zobrazující proteiny na úrovni jednotlivých buněk a tkání s využitím reportérové molekuly DNA a DNA modifikujících procesů. Tato metoda umožňuje přímou vizualizaci proteinů, jejich hladiny, modifikace a interakce v jednotlivých fixovaných buňkách a tkáních. Sondy jsou tvořeny specifickými protilátkami s navázaným oligonukleotidem, který slouží jako reportérová molekula. Pokud dojde k navázání sond v těsné blízkosti, následuje vznik kružnicové DNA, jež slouží jako templát pro amplifikaci otáčivou kružnicí. Amplifikační reakce umožňuje vizualizaci sledované interakce. Ve srovnání s dostupnými molekulárně-biologickými metodami vycházejícími z genového inženýrství, PLA *in situ* umožňuje studovat endogenní proteiny v jejich přirozených podmínkách, a může být tudíž použita pro studium klinického materiálu. PLA *in situ* je využitelná v jakémkoliv výzkumné oblasti zaměřené na studium proteinových interakcí, jako je studium buněčných signálních drah, identifikace cílů farmakologicky účinných látek či v onkologické diagnostice.

Klíčová slova

in situ PLA – proteinové interakce – metody detekce proteinů – „proximity ligation“

Summary

To understand cellular processes and events responsible for their perturbations, proteomic analyses are needed in biomedical research and clinical diagnostics. Several techniques based on specifically binding reagents (antibodies) or recombinant proteins (GFP fusion protein, methods of fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer) are generally used to study protein location and activity resulting from secondary modifications and interactions. The *in situ* proximity ligation assay represents a novel technique of *in situ* protein imaging using DNA as a reporter molecule and DNA amplification processes. This method enables direct visualization of single molecules, their levels, modifications and pattern of interactions in individual fixed cells and tissues. Proximity probes consist of specific antibody with attached oligonucleotides that are used as reporter molecules for identification of such events. Proximity probes guide the formation of a circular DNA strand when bound in close proximity. The DNA circle after that serves as a template for rolling-circle amplification allowing the interaction to be visualized. Compared to available proteomic techniques benefiting from genetic engineering, *in situ* PLA enables study of endogenous proteins in their natural environment and thus can be used for clinical specimens. The areas of applicability where proximity ligation procedure can be used include any research field where protein interaction measurements are important, such as signaling pathway studies, monitoring of pharmacological treatment targets and oncological diagnostics.

Key words

in situ PLA – protein interaction – protein detection methods – proximity ligation

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE “uniform requirements” for biomedical papers.



Mgr. Veronika Brychtová
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: vebrychtova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 31. 1. 2014

Přijato/Accepted: 25. 3. 2014

Úvod

Proteiny jsou biomakromolekuly, které v buňkách zprostředkovávají velké množství funkcí včetně enzymatických reakcí, transportu, buněčné signalizace, replikace a dalších. K zajištění fyziologických podmínek potřebných pro správnou funkci proteinu je mimo jiné nezbytná jeho správná subcelulární lokalizace. Ta určuje jeho aktivitu prostřednictvím vazeb s interakčními partnery a post-translačních modifikací a umožňuje tak proteinům zapojit se do funkčních biologických drah [1]. Zjednodušeně řečeno, pokud je správné množství proteinu ve správný čas na správném místě, dochází v rámci buňky k fyziologickému transportu materiálu a informací. Nevhodná lokalizace proteinu vede k jeho inaktivaci nebo naopak ke škodlivé aktivaci na nevhodném místě, což přispívá ke vzniku mnoha onemocnění. Mezi onemocnění, jejichž etiologie zahrnuje aberantní lokalizace proteinů patří metabolické poruchy, neurodegenerativní, kardiovaskulární a nádorová onemocnění [1].

Je známo, že k tumorigenezi přispívá mimo jiné z nevhodné lokalizace plynoucí změna v proteinovém interaktomu (soubor interagujících proteinů) a změna post-translačních modifikací proteinů. Pro správnou funkci nádorových supresorů je podstatná jejich jaderná lokalizace, a proto jejich translokace do cytoplazmy může představovat jeden z aktivačních mechanismů, který

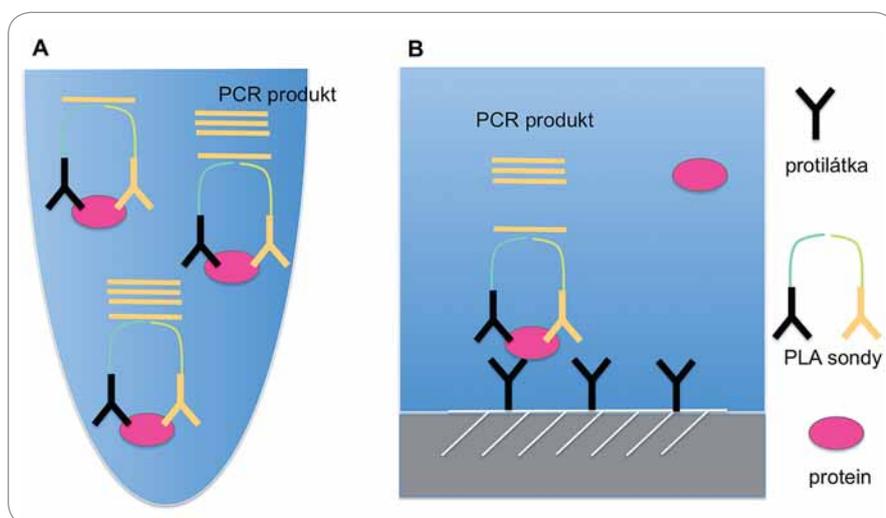
vede k nekontrolované proliferaci buněk [2]. Například cytoplazmatická lokalizace proteinu FOXO3a představuje horší prognózu u pacientek s karcinomem mléčné žlázy a naopak jaderná lokalizace zmiňovaného proteinu koreluje se zvýšenou senzitivitou k radiační terapii [3,4]. Podobně inhibitory buněčného cyklu jako p21WAF1 a p27 se vlivem nevhodné lokalizace mimo jádro stávají tumorigenní. Cytoplazmatický p21WAF1 představuje marker negativní prognózy u HER2 pozitivního karcinomu mléčné žlázy [5]. Cytoplazmatická lokalizace p21WAF1 je markerem rezistence k léčbě cisplatinou u karcinomu vaječniku [6]. Podobným příkladem může být protein p27, jehož mimojaderná lokalizace představuje negativní prognostický faktor u mnoha nádorových onemocnění včetně karcinomu mléčné žlázy [7], hepatocelulárního karcinomu [8], karcinomu vaječníků [9] a karcinomu tlustého střeva [10]. Vedle nádorových supresorů mohou být také ve směru do jádra translokovány membránové receptory tyrozinkináz. Například jaderná lokalizace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) je asociována s rezistencí tumorů k léčbě cetuximabem a cisplatinou u řady nádorových onemocnění [11,12].

Metody používané pro detekci konkrétního proteinu, jejich post-translačně modifikované formy nebo proteinových interakcí využívají k označení cílového proteinu převážně vazby se specifickou

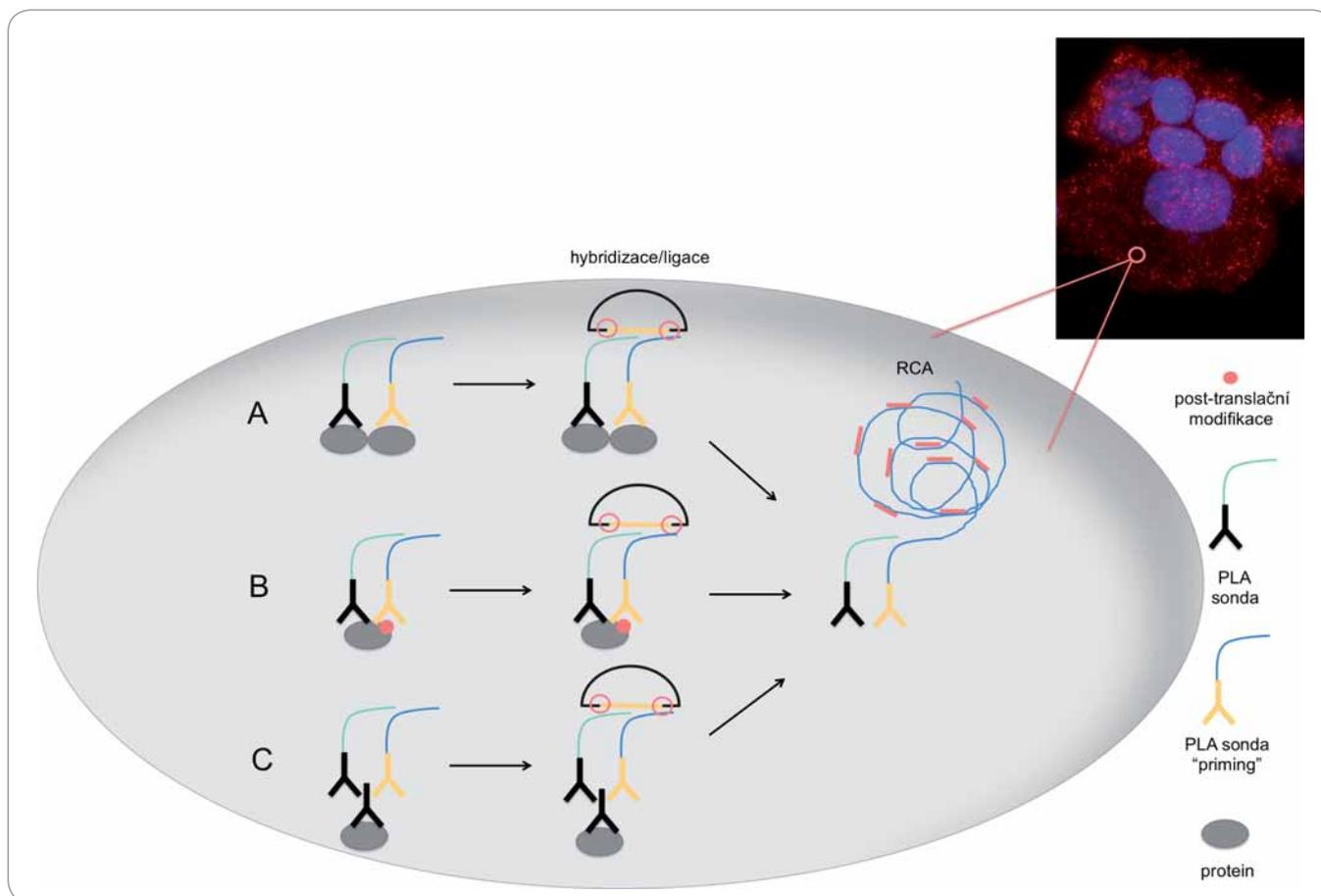
protilátkou nebo zavedení značky do cílového proteinu [13]. První přístup zahrnuje metody, jako je westernový přenos spojený s imunodetekcí, sandwichová ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), ko-immunoprecipitace s následnou identifikací pomocí hmotnostní spektrometrie a imunohistochemie. Metody přímého značení proteinu jsou založeny na principu syntézy fúzního proteinu s reportérovou molekulou, jako je např. GFP (green fluorescent protein) nebo luciferáza, které umožňují detekci cílového proteinu přímo ve vzorku. Mezi tyto metody patří metody FRET (fluorescence resonance energy transfer), BRET (bioluminescence resonance energy transfer) [14]. Tyto metody, při nichž jsou buňky modifikovány genetickými konstrukty, jsou vynikající nástroj pro studium funkcí proteinů, avšak jsou zcela nepoužitelné v případě studií prováděných na klinickém materiálu nebo v diagnostice. „Proximity ligation assay“ (PLA) *in situ*, která je předmětem tohoto přehledového článku, představuje techniku kombinující vazbu specifické protilátky s reportérovým systémem a umožňující tak přímo sledovat interakce endogenních proteinů na úrovni jednotlivých buněk a tkání.

„Proximity ligation assay“

PLA představuje metodu navrženou pro detekci proteinů, proteinových komplexů a post-translačních modifikací s využitím specifických protilátek, které na sobě nesou navázané krátké DNA vlákno s funkcí reportérové molekuly [15,16]. V případě navázání dvojice sond na cílové epitopy, které se nachází v těsné blízkosti v řádu desítek nanometrů, mohou oligonukleotidy hybridizovat s komplementárním DNA vláknem. Následnou ligací dochází k přemostění mezi oběma sondami a vzniká tak amplifikovatelná reportérová DNA. Ta je markerem vazby PLA sond v těsné blízkosti a může být kvantifikována metodou PCR. Množství signálu poskytnutého DNA reportérem odráží původní koncentraci cílových proteinů ve sledovaných vzorcích. Výhodou této metody je vznik reportérové molekuly pouze za předpokladu dvojí vazby PLA sond, čímž je snížen vznik nespecifických signálů



Obr. 1. Schematické znázornění principu PLA technik v kapalně (A) a pevně (B) fázi.



Obr. 2. Schéma detekce dimerního proteinového komplexu, post-translační modifikace proteinu a samotného proteinu metodou PLA *in situ* s využitím amplifikace otáčivou kružnicí (RCA) za vzniku amplifikačního produktu.

A. PLA sondy se váží k dvěma interagujícím proteinům s následnou hybridizací cirkularizačních oligonukleotidů a ligací. B. Identifikace post-translační modifikace proteinu pomocí specifické PLA sondy. C. Detekce proteinu pomocí sekundárních PLA sond.

a amplifikována tak může být pouze ligovaná DNA [13].

PLA technologie má několik modifikací vycházejících z charakteru studovaného materiálu: PLA v kapalně fázi (solution phase PLA), PLA v pevně fázi (solid phase PLA) a PLA *in situ*.

PLA v kapalně fázi představuje původní variantu „proximity ligation“ techniky, která pro detekci sledovaného analytu využívá identifikaci cílové molekuly pomocí rozpoznání dvou nebo více epitopů pomocí specifických PLA sond (obr. 1A) [16]. V případě navázání obou sond v těsně blízkosti vzniká reportérová DNA, jež je amplifikována a kvantifikována metodou kvantitativní PCR nebo sekvencováním nové generace [17]. Tato metoda nevyžaduje promývací kroky a je vzhledem ke své nenáročnosti na provedení vhodná pro analýzu velkého

množství vzorků. Vysoká citlivost v řádu femtomolů umožňuje detekci proteinů i při objemu vzorku pouze 1 μ l [16]. PLA v pevně fázi má podobný princip jako klasická sandwichová ELISA, neboť k detekci proteinů využívá protilátky navázané na pevnou fázi (mikrotitrační desička) (obr. 1B). Detekce navázaného proteinu probíhá pomocí dvou PLA sond, které vedou ke vzniku reportérového DNA vlákna. Detekce a kvantifikace reportérové DNA probíhá analogicky jako v případě PLA v kapalně fázi. Toto provedení PLA je značně citlivé, protože pro vznik signálu vyžaduje vazbu celkem tří specifických protilátek [17].

„Proximity ligation assay“ *in situ*

PLA *in situ* je varianta PLA techniky, která umožňuje studovat endogenní proteiny ve tkáních a buněčných kulturách. Tuto

in situ techniku lze využít pro detekci jakýchkoliv molekul nebo komplexů, proti nimž je možné připravit specifickou protilátku. PLA sondou tak může být primární protilátka konjugovaná s oligonukleotidem, která přímo interaguje s cílovým proteinem (obr. 2A, B), nebo konjugovaná sekundární protilátka (komerčně dostupné sondy), která interaguje s primární protilátkou již navázanou k cílové molekule [18,19] (obr. 2C). Alternativně lze vedle klasických protilátek konjugovaných s oligonukleotidy použít i jiné specificky se vážící molekuly, jako jsou rekombinantní afinitní proteiny „DARPin“ (uměle připravené proteiny napodobující funkci protilátek) a DNA aptamery (uměle připravené oligonukleotidy specificky vážící cílovou molekulu) [13,15,20–22].

Aby bylo dosaženo signálu v místě reálného výskytu sledované mole-

kuly a nedocházelo k jeho difúzi, PCR je v *in situ* modifikaci nahrazena DNA amplifikací tak, že produkt amplifikace zůstává navázaný na cílový protein (obr. 2). PLA *in situ* je navržena tak, že dvojice sond slouží jako templát pro syntézu kružnicové DNA. Ta je následně amplifikována pomocí vysoce účinné Phi29 DNA polymerázy mechanismem označovaným jako amplifikace otáčivou kružnicí (rolling circle amplification – RCA). RCA je spouštěna jednou z PLA sond označovanou jako „priming“. Produkt této reakce je prakticky prodloužením PLA sond, a tudíž zůstává fyzicky spojen s cílovými molekulami (obr. 2). RCA produkt má velikost několika set repetitivních elementů o velikosti přibližně 100 kb a je vizualizován hybridizací s fluoroforem značenými oligonukleotidy. Takto vzniklý signál o velikosti menší než 1 μm lze pozorovat fluorescenčním mikroskopem a je snadno odlišitelný od nespecifického signálu [18,23].

Kromě studia proteinových komplexů je možné PLA *in situ* využít také pro studium interakcí mezi proteiny a nukleovými kyselinami. V tomto případě se využívá jednovláknová DNA sonda, která zároveň slouží jako templát pro ligační reakci. Metodicky tento postup vyžaduje, aby byla genomová DNA nejprve tepelně nebo enzymaticky denaturována na jednotlivé řetězce, ke kterým by mohla specifická sonda hybridizovat [22,24].

Technika PLA *in situ* není omezena pouze na detekci blízkosti jednoho páru cílových molekul. Detekce většího množství molekul vyžaduje pouze použití většího množství specifických oligonukleotidů. Pro vizualizaci interakce mezi třemi molekulami je zapotřebí tří různých PLA sond, přičemž vznik kružnicové reportérové DNA je závislý na přítomnosti všech tří sond [18,23].

Mezi další aplikace PLA *in situ* patří identifikace proteinových post-translačních modifikací. Pomocí specifických PLA sond lze sledovat fosforylační status proteinů [25] nebo jejich glykosylaci [26].

Kombinace PLA *in situ* s dalšími metodami

Velké množství onemocnění se projevuje změnami v proteinové expresi či funkci, které jsou způsobeny genetic-

kými aberacemi nebo epigenetickými modifikacemi. Pro stanovení chromozomálních aberací na úrovni jednotlivých buněk bývá často využívána metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Kombinace PLA *in situ* s FISH poskytuje informace o amplifikačním statusu genů současně s hodnocením interakcí deregulovaných proteinů. Genetická analýza je takto doplněna o proteomickou analýzu ve shodném materiálu [27].

Alternativou k FISH může být využití „padlock“ sondy, což je oligonukleotid, jehož 3' a 5' konce jsou komplementární k přilehlým oblastem na cílové DNA sekvenci. Hybridizací jsou oba konce „padlock“ sondy přiblíženy k sobě a DNA je poté ligována [28]. Takto vzniklá kružnicová DNA je po navázání primeru templátem pro RCA. Ve srovnání s FISH je „padlock“ sonda mnohem specifičtější, neboť je citlivá i na jednonukleotidové záměny. Signál je podobně jako při PLA generován amplifikací otáčivou kružnicí a povahou je totožný se signálem poskytovaným PLA. Tento druh sondy je vhodný pro mRNA genotypizaci a v kombinaci s PLA *in situ* představuje nástroj pro simultánní detekci mutací, genové exprese a proteinových interakcí [23].

Diskuze a závěr

PLA *in situ* představuje relativně novou techniku rozšiřující portfolio experimentálních přístupů pro vizualizaci proteinů na úrovni buněk a tkání přibližně od poloviny minulého století. Od té doby prodělala vývoj, který rozšířil její možné využití. Tato metoda představuje efektivní nástroj pro analýzu funkčního stavu proteinů, jehož hlavní výhodou je schopnost amplifikace signálu, jež umožňuje detekci jednotlivých sledovaných molekul [18].

Perspektivou PLA techniky je souběžná analýza, která bude schopna paralelně sledovat více cílů v totožném materiálu. Z hlediska molekulární onkologie se nabízí využití této techniky k získání informací o povaze a chování nádorů v konkrétním mikroprostředí, čímž může přispět k lepší diagnostice a přesnější predikci léčebné odpovědi [18].

Vzhledem k ostatním metodám může PLA *in situ* nabídnout analýzu proteino-

vých komplexů nebo sekundárních modifikací pro jakýkoliv protein, proti kterému je dostupná vhodná protilátka. Ve srovnání s metodami FRET/BRET má PLA *in situ* dvě významné výhody, kterými je za prvé možnost studovat endogenní proteiny v přirozeném prostředí bez vedlejších vlivů způsobených nadměrnou nebo ektopickou expresí. Další výhodou je charakter signálu, při kterém PLA generuje díky RCA mnohonásobně amplifikovaný signál, jenž je jasně rozlišitelný od nespecifické fluorescence [18].

Ve farmakologii má PLA *in situ* využití při screeningu a validaci látek s potenciálně léčivými účinky v geneticky nemodifikovaných buněčných liniích. Multiplexní PLA *in situ* v tomto případě poskytuje pohled, jak látka – potenciální léčivo – ovlivňuje množství buněčných signálních drah a jejich vzájemné interakce. Ve srovnání s jinými metodami založenými na měření celkové fluorescenční intenzity je PLA *in situ* zvýhodněna měřením jednotlivých produktů amplifikace poskytujících jasný signál mnohem méně zatížený autofluorescencí nebo slábnutím signálu. Navíc je tato metoda citlivější při sledování méně abundantních proteinů, neboť i jednotlivý signál poskytnutý jedinou cílovou molekulou je metodou PLA *in situ* značně amplifikovaný, a tudíž detekovatelný [29].

Kromě studia komplexů a proteinových modifikací může být PLA teoreticky využita jako „molekulární pravítka“, které na základě variability v délce oligonukleotidu nebo charakteru protilátky umožňuje měřit vzdálenosti mezi sledovanými epitopy [18].

Mezi potenciální nedostatky této metody patří především nemožnost využití PLA *in vivo*, což znemožňuje studovat dynamiku a kinetiku proteinových interakcí. Dále tato metoda není využitelná pro *de novo* identifikaci nových interakčních partnerů, ale pouze ověřuje interakce známých interakčních partnerů. Diskutabilní je také spolehlivost signálů vzniklých PLA *in situ*. Přestože jedním z cílů PLA techniky je ověření proteinových interakcí, signál může být potenciálně generován i párem proteinů, které se nacházejí ve velmi těsné blízkosti, ale bez vzájemných interakcí. Experimenty využívající malé molekuly přerušující

protein-proteinové vazby však prokázaly specifickou PLA *in situ* detekovat skutečné interakce [18].

Závěrem lze konstatovat, že PLA *in situ* má značné možnosti využití v základním i aplikovaném výzkumu, při vývoji nových terapeutik a v klinické diagnostice, protože umožňuje komplexně porozumět buněčným procesům na úrovni proteinů, jejich lokalizace, modifikací, vzájemných protein-proteinových interakcí nebo interakcí s jinými makromolekulami, jako jsou RNA a DNA.

Literatura

- Hung MC, Link W. Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci* 2011; 124(20): 3381–3392. doi: 10.1242/jcs.089110.
- Fabbro M, Henderson BR. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* 2003(2); 282: 59–69.
- Hu MC, Lee DF, Xia W et al. IκB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 2011; 117(2): 225–237.
- Chen MF, Fang FM, Lu C et al. Significance of nuclear accumulation of Foxo3a in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 71: 1220–1229. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.02.077.
- Xia W, Chen J, Zhou X et al. Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10(11): 3815–3824.
- Xia X, Ma Q, Li X et al. Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *BMC Cancer* 2011; 11: 399. doi: 10.1186/1471-2407-11-399.
- Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002; 8(10): 1153–1160.
- Nan KJ, Jing Z, Gong L. Expression and altered subcellular localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10(10): 1425–1430.
- Rosen DG, Yang G, Cai KQ et al. Subcellular localization of p27kip1 expression predicts poor prognosis in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(11): 632–637.
- Ogino S, Shima K, Noshio K et al. A cohort study of p27 localization in colon cancer, body mass index, and patient survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(6): 1849–1858. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0181.
- Li C, Iida M, Dunn E et al. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 2009; 28: 3801–3813. doi: 10.1038/onc.2009.234.
- Hsu S, Miller S, Wang Y et al. Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am J Transl Res* 2009; 1(3): 249–258.
- Weibrecht I, Leuchowius KJ, Clausson CM et al. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics* 2010; 7(3): 401–409. doi: 10.1586/epr.10.10.
- Pfleger KD, Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* 2006; 3(3): 165–174.
- Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol* 2002; 20(5): 473–477.
- Gullberg M, Gústafsdóttir SM, Schallmeiner E et al. Cytokine detection by antibody-based proximity ligation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(22): 8420–8424.
- Nong RY, Wu D, Yan J et al. Solid-phase proximity ligation assays for individual or parallel protein analyses with readout via real-time PCR or sequencing. *Nat Protoc* 2013; 8(6): 1234–1248. doi: 10.1038/nprot.2013.070.
- Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 2006; 3(12): 995–1000.
- Jarvius M, Paulsson J, Weibrecht I et al. In situ detection of phosphorylated platelet-derived growth factor receptor beta using a generalized proximity ligation method. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(9): 1500–1509.
- Gu GJ, Friedman M, Jost C et al. Protein tag-mediated conjugation of oligonucleotides to recombinant affinity binders for proximity ligation. *N Biotechnol* 2013; 144–152. doi: 10.1016/j.nbt.2012.05.005.
- Gustafsdóttir SM, Schlingemann J, Rada-Iglesias A et al. In vitro analysis of DNA-protein interactions by proximity ligation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(9): 3067–3072.
- Gomez D, Shankman LS, Nguyen AT et al. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods* 2013; 10(2): 171–177. doi: 10.1038/nmeth.2332.
- Koos B, Andersson L, Clausson CM et al. Analysis of protein interactions in situ by proximity ligation assays. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 377: 111–126. doi: 10.1007/82_2013_334.
- Weibrecht I, Gavrilovic M, Lindbom L et al. Visualising individual sequence-specific protein-DNA interactions in situ. *N Biotechnol* 2012; 29(5): 589–598. doi: 10.1016/j.nbt.2011.08.002.
- Koos B, Paulsson J, Jarvius M et al. Platelet-derived growth factor receptor expression and activation in choroid plexus tumors. *Am J Pathol* 2009; 175(4): 1631–1637. doi: 10.2353/ajpath.2009.081022.
- Pinto R, Carvalho AS, Conze T et al. Identification of new cancer biomarkers based on aberrant mucin glycoforms by in situ proximity ligation. *J Cell Mol Med* 2012; 16(7): 1474–1484. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01436.x.
- Renfrow JJ, Scheck AC, Dhawan NS et al. Gene-protein correlation in single cells. *Neuro Oncol* 2011; 13(8): 880–885. doi: 10.1093/neuonc/nor071.
- Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M et al. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science* 1994; 265(5181): 2085–2088.
- Leuchowius KJ, Jarvius M, Wickström M et al. High content screening for inhibitors of protein interactions and post-translational modifications in primary cells by proximity ligation. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9(1): 178–183. doi: 10.1074/mcp.M900331-MCP200.

Expres a purifikace proteinů

Protein Expression and Purification

Růčková E., Müller P., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Metody exprese a purifikace rekombinantních proteinů umožňují produkci a detailní charakterizaci proteinů v základním výzkumu během *in vitro* experimentů, ale také přípravu proteinů s terapeutickým využitím. Publikace shrnuje základní postupy od přípravy expresních vektorů až po techniku afinitní purifikace. Dále pojednává o vlastnostech různých prokaryotických a eukaryotických expresních systémů a možnostech jejich využití. Molekulární klonování, které slouží k přípravě expresních vektorů pro rekombinantní proteiny, umožňuje cíleně modifikovat vlastnosti těchto proteinů tak, aby byla usnadněna jejich purifikace a také pozměněna jejich stabilita, aktivita nebo funkce. V současné době je k dispozici široká škála metodických přístupů, jež umožňují rychlou a efektivní přípravu expresních vektorů. Zvolený produkční organizmus a způsob purifikace rekombinantního proteinu určují výběr expresního vektoru. První volbou často bývá expresní systém využívající bakterii *Escherichia coli*, jehož přednostmi jsou zejména technická, časová i finanční nenáročnost. Tento expresní systém není příliš vhodný pro produkci komplexních savčích proteinů, pro které jsou optimální expresní systémy založené na využití eukaryotických organizmů (kvasinky, hmyzí buňky nebo savčí buňky). Kultivace hmyzích a savčích buněk je však technicky i finančně náročná. Rekombinantní proteiny jsou purifikovány nejčastěji metodou afinitní chromatografie využívající specifickou interakci peptidu nebo proteinu s afinitní matricí. Tyto peptidy či proteiny jsou fúzovány s N- nebo C-koncem purifikovaného proteinu. Purifikace probíhá ve třech krocích, kdy je rekombinantní protein prostřednictvím afinitních značek specificky zachycen na matici chromatografické kolony, dále následuje promývací krok, po kterém je uvolněn z kolony čistý protein.

Klíčová slova

rekombinantní protein – molekulární klonování – purifikace – expresní systém

Summary

Production of recombinant proteins is essential for many applications in both basic research and also in medicine, where recombinant proteins are used as pharmaceuticals. This review summarizes procedures involved in recombinant protein expression and purification, including molecular cloning of target genes into expression vectors, selection of the appropriate expression system, and protein purification techniques. Recombinant DNA technology allows protein engineering to modify protein stability, activity and function or to facilitate protein purification by affinity tag fusions. A wide range of cloning systems enabling fast and effective design of expression vectors is currently available. A first choice of protein expression system is usually the bacteria *Escherichia coli*. The main advantages of this prokaryotic expression system are low cost and simplicity; on the other hand this system is often unsuitable for production of complex mammalian proteins. Protein expression mediated by eukaryotic cells (yeast, insect and mammalian cells) usually produces properly folded and posttranslationally modified proteins. However, cultivation of insect and, especially, mammalian cells is time consuming and expensive. Affinity tagged recombinant proteins are purified efficiently using affinity chromatography. An affinity tag is a protein or peptide that mediates specific binding to a chromatography column, unbound proteins are removed during a washing step and pure protein is subsequently eluted.

Key words

rekombinant protein – molecular cloning – purification – expression system

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Eva Růčková
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: ruckova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 22. 1. 2014

Přijato/Accepted: 20. 3. 2014

Úvod

Purifikované proteiny mají v současné době široké využití nejen v základním výzkumu, ale i v aplikovaném výzkumu jako terapeutické látky pro léčbu různých onemocnění od hemofilie po komplexní protinádorovou terapii nebo výrobu vakcín. Proteiny využívané v medicíně musí splňovat přísná kritéria (např. je omezeno použití antibiotik a jiných toxických látek), a proto jsou pro jejich produkci vyvíjeny speciální expresní systémy. Předkládaná publikace je tudíž zaměřena na popis obecných metod purifikace proteinů využívaných v základním výzkumu.

Purifikace proteinů je obecně sled procesů vedoucích k získání jediného proteinu z komplexní směsi. Izolovat čisté proteiny je nezbytné pro řadu *in vitro* experimentů, mezi něž patří charakterizace jejich funkce, struktury a vzájemných interakcí, a které dále dovolují objasnit jejich úlohu v biologických systémech. Ve většině případů jsou pro účely purifikace připravovány rekombinantní proteiny metodou molekulárního klonování, která umožňuje protein podle potřeby modifikovat. Geny kódující požadované proteiny jsou vloženy do expresních vektorů a ty jsou vpraveny do různých prokaryotických nebo eukaryotických buněk, jež poté zajistí syntézu rekombinantních proteinů. Purifikaci těchto proteinů usnadňuje připojení afinitních značek (tagů) a použití metod afinitní chromatografie, které jsou založeny na specifické vazbě těchto značek na chromatografickou kolonu. Na kvalitu i kvantitu purifikovaných proteinů jsou kladeny vysoké nároky, a proto jsou neustále vyvíjeny nové metodické přístupy.

Historický přehled

Proteiny jsou studovány a purifikovány už více než 200 let. Již v roce 1789 izoloval Antoine Fourcroy z rostlin látku, které se svými vlastnostmi podobaly vaječnému bílku. Avšak až o téměř 50 let později, v roce 1838, tyto látky blíže popsal chemik Gerhardus Johannes Mulder a v témže roce pro ně navrhl Jöns Jacob Berzelius název protein (vycházející z řeckého slova proteos – první v řadě). Do začátku 20. století byly jediné známé metody separace proteinů filtrace, precipitace či krystalizace, přičemž

některé z těchto technik jsou používány dodnes. Takto např. Felix Hoppe-Seyler v roce 1840 připravil první krystaly hemoglobinu nebo Franz Hofmeister v roce 1889 opakovanou krystalizací purifikoval ovalbumin. První separace proteinů na koloně byla provedena v roce 1903 botanikem Mikhailem Tswettem, který na matici z uhlíčitanu vápenatého separoval rostlinné pigmenty a následně v roce 1906 pro tuto metodu zavedl pojem chromatografie. Další technika separace proteinů, centrifugace, byla vyvinuta Theodorem Svedbergem v roce 1924. V následujících letech byl vynalezen princip elektroforézy, afinitní chromatografie a iontově výměnné chromatografie (ion exchange chromatography – IEX). Od 50. let 20. století následoval intenzivní vývoj různých typů hydrofilních chromatografických maticí. Nejprve byl využit škrob či upravený dextran Sephadex pro rozlišení proteinů podle velikosti [1]. Později byly připraveny další hydrofilní materiály pro elektroforézu a chromatografii, jako např. polyakrylamid [2], metakrylát [3], agaróza [4] nebo porézní křemík [5]. Výrobu moderních maticí pro afinitní chromatografii umožnil objev metody navázání liganů k polysacharidům (např. v agaróze) kovalentní vazbou [6]. V průběhu následujících let byl vyvinut velký počet chromatografických médií a souběžně také různé techniky purifikace proteinů včetně automatizovaných chromatografických systémů, jako třeba FPLC (fast protein liquid chromatography).

Zpočátku byly proteiny purifikovány z jejich přirozených zdrojů, což bylo technicky i finančně náročné. Proto se počáteční analýzy soustředily na proteiny, které mohou být purifikovány ve velkých množstvích, a to např. z krve, vaječného bílku, nebo trávicí enzymy získané ze zvířat na jatkách. Takto byl koncem 50. let firmou Armour & Co., jež působila v masném průmyslu, purifikován kilogram bovinní pankreatické ribonukleázy (RNázaA), který byl věnován pro vědecké účely. Snadno a rychle dostupná RNázaA se stala základním proteinem pro biochemické analýzy, na jejichž základě byla dokonce Christianu Anfinsenovi, Stanfordu Mooreovi a Williamu H. Steinovi udělena v roce 1972 Nobelova cena za chemii.

Mohutný nárůst technologií purifikace proteinů nastal po objevu metody přípravy rekombinantní DNA na počátku 70. let 20. století [7–9]. Molekulární klonování tak umožnilo heterologní expresi zvoleného proteinu v hostitelském organismu (expresní systém), nejčastěji v bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*). Touto technologií lze vytvářet také fúzní (chimerické) proteiny s přidanými afinitními značkami (tagy), které výrazně usnadňují purifikaci a zvyšují výtěžek a čistotu za použití univerzálních purifikačních postupů. Dále lze přidávat reportérové sekvence, např. fluorescenční proteiny, jež umožňují sledovat expresi proteinů *in vivo* přímo v buňce. Díky těmto expresním systémům je dosažena mnohem vyšší koncentrace studovaného proteinu, než jaká se v buňce přirozeně nachází.

Příprava expresních vektorů

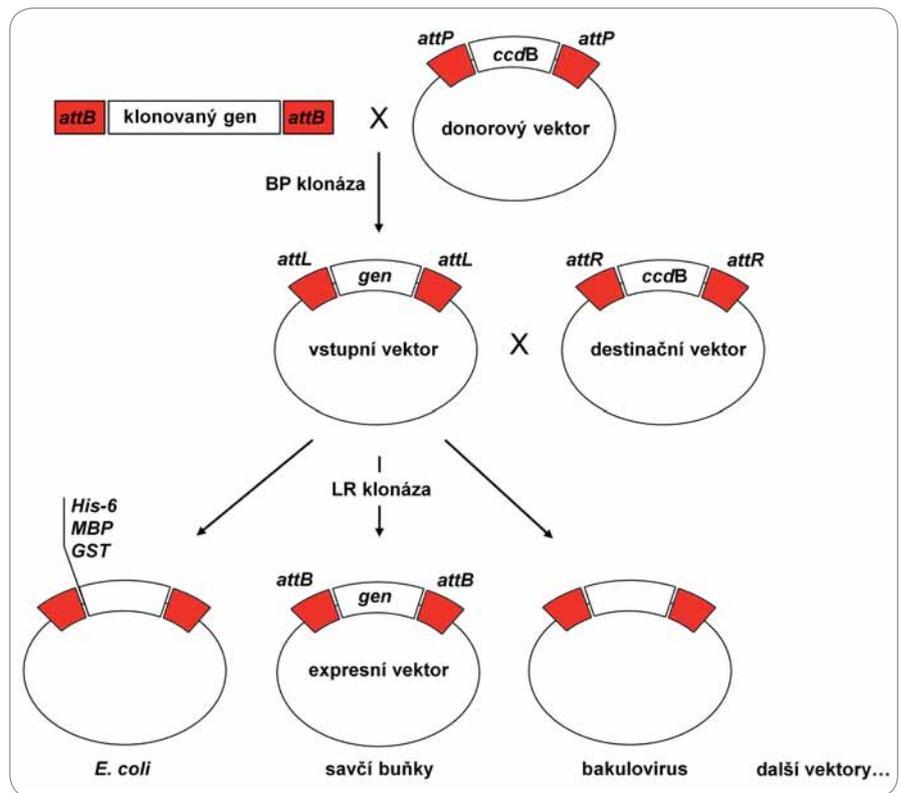
Vektory v molekulární biologii slouží k přepravě cizorodé DNA do hostitelské buňky, kde je tato DNA replikována a/nebo exprimována. Nejběžnější typ vektoru jsou plazmidy, cirkulární molekuly extrachromozomální DNA, které se v bakteriální buňce autonomně množí a přenášejí se při dělení do následujících generací. Často jsou využívány také virové vektory, což jsou rekombinantní viry, jež mají část genomu nahrazenou expresní kazetou, která po infekci (transdukci) hostitelských buněk zajistí produkci rekombinantního proteinu. Alternativou ke klasickým klonovacím systémům, ve kterých je vložení cizorodé DNA založeno na restrikcí štěpení a následné ligaci, jsou systémy založené na rekombinaci, jež umožňují snadné a efektivní klonování požadovaných genů. K dispozici je několik komerčně dostupných expresních systémů využívajících rekombinaci, třeba Gateway (Life Technologies, USA) a Creator (Clontech, USA). Expresní systém Gateway využívá rekombinaci mezi dvěma heterologními sekvencemi, která je zprostředkována enzymy pocházejícími z bakteriofága lambda. Ty rozeznávají specifické signální sekvence ohraničující cílový gen (nazývané att sekvence) [10]. V prvním kroku je připraven univerzální vstupní vektor, který slouží jako základ

pro vytvoření libovolných expresních vektorů (obr. 1). Mezi další mechanismy klonování náleží např. TOPO klonování (Life Technologies, USA) nebo klonování nezávislé na ligaci LIC (ligation independent cloning) (dodávají různé firmy, jako třeba New England Biolabs, USA nebo Merck, Germany).

Typy expresních systémů

Obecně je prvním krokem pro expresi v prokaryotických i eukaryotických buňkách vpravení vektoru, který obsahuje gen pro syntézu rekombinantního proteinu, do buňky. Dále následuje kultivace, během níž dochází k transkripci a translaci kódující DNA. Buňky jsou následně lyzovány a protein je purifikován. Vlastnosti jednotlivých expresních systémů jsou shrnuty v tab. 1.

Nejčastěji používaným expresním systémem jsou bakterie *E. coli*, protože se snadno kultivují, rychle se množí a umožňují získat vysoké výtěžky rekombinantních proteinů. Velkou výhodou jsou nízké náklady na kultivační média. Pro expresi proteinů existuje široký výběr komerčních expresních vektorů, které umožňují použití řady N- i C-koncových tagů, stejně jako dostatek různých expresních kmenů optimalizovaných pro speciální aplikace. Expres rekombinantních proteinů může být u *E. coli* řízena několika promotory. Nejčastěji je využíván silný promotor T7, dále pak lambda P1, trc nebo arabinózový promotor. Bakteriální expresní systém má však také mnoho nevýhod. Například problém s nedostatkem tRNA pro některé kodony převažující u eukaryotické mRNA byl vyřešen vytvořením expresních kmenů bakterií, které nesou plazmidy kódující tyto vzácné tRNA. Jedná se např. o kmeny BL21(DE3) CodonPlus (Stratagene, USA) nebo Rosetta (Merck, Germany). Závažnější omezení jako neexistující posttranslační úpravy a aparát molekulárních chaperonů, jež eukaryotickým proteinům zajišťují biologickou aktivitu, lze zatím řešit pouze částečně. Pracuje se na vytvoření kmenů, které zprostředkovávají alespoň jednoduchou glykosylaci [11,12] a chybějící chaperony je možno doplnit jejich ko-expresí s požadovaným proteinem (Clontech, USA). Přes veškeré úsilí jsou



Obr. 1. Schematické znázornění principu klonovacího systému Gateway.

Sekvence klonovaného genu je rekombinací zprostředkovanou BP klonázou vložena do donorového vektoru, čímž vznikne univerzální vstupní vektor. Sekvence klonovaného genu může být vložena do destinačního vektoru reakcí zprostředkovanou LR klonázou. Sekvence, mezi kterými probíhá rekombinace, jsou znázorněny červeně. Upraveno dle [24].

zvláště velké multi-doménové eukaryotické proteiny náchylné k denaturaci a vytváří nerozpustná inkluzní tělíska. Pro jejich solubilizaci jsou vyžadovány speciální postupy, mezi které patří úplná denaturace a následná renaturace.

Nejjednodušší eukaryotický expresní systém využívá kvasinky, jednobuněčné organizmy, které lze snadno kultivovat v suspenzi podobně jako *E. coli*. Jejich výhodou je schopnost provádět jednoduché posttranslační modifikace, možnost kultivace do vysokých hustot a nízké náklady na kultivační média. Nejčastěji jsou využívány kmeny *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*.

Expresní systém využívající hmyzí buňky infikované bakuloviry poskytuje proteiny, které jsou posttranslačně modifikovány podobně jako v savčích buňkách. Replikace bakulovirů není závislá na pomocném viru, mohou být kultivovány i v suspenzích hmyzích buňkách

a lze dosáhnout vysoké multiplicity infekce. Nevýhodou hmyzích buněk jsou ale vyšší náklady na kultivaci a větší náročnost na čas i odbornou manipulaci. Existuje několik typů expresních systémů lišících se ve způsobu přípravy rekombinantního bakuloviru, např. homologní rekombinací, transpozicí nebo technologií Gateway. Posledně jmenovaná metoda je využita v systému BaculoDirect (Life Technologies, USA), který umožňuje vložení požadovaného genu přímo do virového genomu, čímž se výrazně zkracuje doba pro vytvoření infekčního viru. Expres genu je řízena silným polyhedrinovým promotorem, jenž zajišťuje vysokou hladinu rekombinantního proteinu.

Savčí buňky produkují rekombinantní proteiny, které jsou ve většině případů plně funkční a posttranslačně modifikované. Tento systém nabízí velkou metodickou variabilitu ve výběru produkční

Tab. 1. Shrnutí vlastností jednotlivých expresních systémů.

	<i>E. coli</i>	Kvasinky	Hmyzí buňky	Savčí buňky
<i>Obecné vlastnosti</i>				
rychlost růstu/doba zdvojení	30 min	90 min	18–24 hod	24 hod
cena růstového média	nízká	nízká	vysoká	vysoká
hladina exprese	vysoká	nízká až vysoká	nízká až vysoká	nízká
sekrece proteinu	sekrece do periplazmy	sekrece do média	sekrece do média	sekrece do média
sekundární struktura proteinu	často denaturované	většinou správná	správná	správná
<i>Posttranslační modifikace proteinu</i>				
N-glykosylace	ne	manóзовý typ	jednoduchá, chybí kyselina sialová	komplexní
O-glykosylace	ne	ano	ano	ano
fosforylace	ne	ano	ano	ano
acetylace	ne	ano	ano	ano
acylace	ne	ano	ano	ano
gama-karboxylace	ne	ne	ne	ano
		Výhody	Nevýhody	
<i>E. coli</i>	nejpoužívanější expresní systém (zkušenosti, velký výběr klonovacích vektorů), snadná kultivace, rychlý růst, snadná kontrola genové exprese, vysoké výtěžky, možnost sekrece proteinu do média, nízké náklady		chybí posttranslační modifikace, protein může postrádat biologickou aktivitu, vysoký obsah endotoxinů	
kvasinky	neprodukují endotoxiny, probíhá glykosylace a tvorba disulfidických můstků, snadná purifikace sekretovaných proteinů, metody pro velkoobjemovou kultivaci, relativně nízké náklady		obtížněji regulovatelná genová exprese, glykosylace odlišná od savčích buněk, nižší výtěžek než u <i>E. coli</i>	
hmyzí buňky (vektory založené na bakulovirech)	posttranslační modifikace podobné savcím, bezpečné (bakulovirus není vůči savcům infekční), relativně vysoká exprese proteinu		produkt nemusí být vždy plně funkční, mírně odlišné N-glykosylace, kultivace časově i finančně náročná	
savčí buňky	biologická aktivita shodná s přirozenými proteiny		kultivace časově i finančně velmi náročná, nízké výtěžky	

linie i ve způsobu vnesení expresního vektoru do buňky. Mezi často používané linie patří třeba HEK 293 (human embryonal kidney) a CHO (chinese hamster ovary), které se vyznačují vysokou rychlostí růstu a schopností snadno přijímat heterologní DNA. Exprese rekombinantních proteinů je řízena konstitutivně aktivními promotory. Nejčastěji se jedná o promotory odvozené z viru SV40 (simian virus 40) nebo CMV (cytomegalovirus) a méně jsou využívány neviróvé promotory např. elongačního faktoru EF-1 α . Vyšší hladiny exprese lze dosáhnout u sekretovaných proteinů, zatímco

exprese vnitrobuněčných proteinů je výrazně nižší. Využití plazmidových vektorů pro tranzientní expresi je nejrychlejší metoda produkce rekombinantních proteinů, neboť k jejich syntéze dochází ihned po vnesení vektoru do jádra. Plazmidové vektory lze také využít pro přípravu stabilních buněčných linií, které mají cizorodou DNA začleněnou ve své genomové DNA, a tudíž trvale exprimují rekombinantní protein. Příprava virových vektorů je časově i technicky náročná a navíc podléhá vyššímu stupni bezpečnostní kontroly. Výhodou jsou pak vysoké výtěžky rekombinantních

proteinů a možnost použití pro velkoobjemové kultivace.

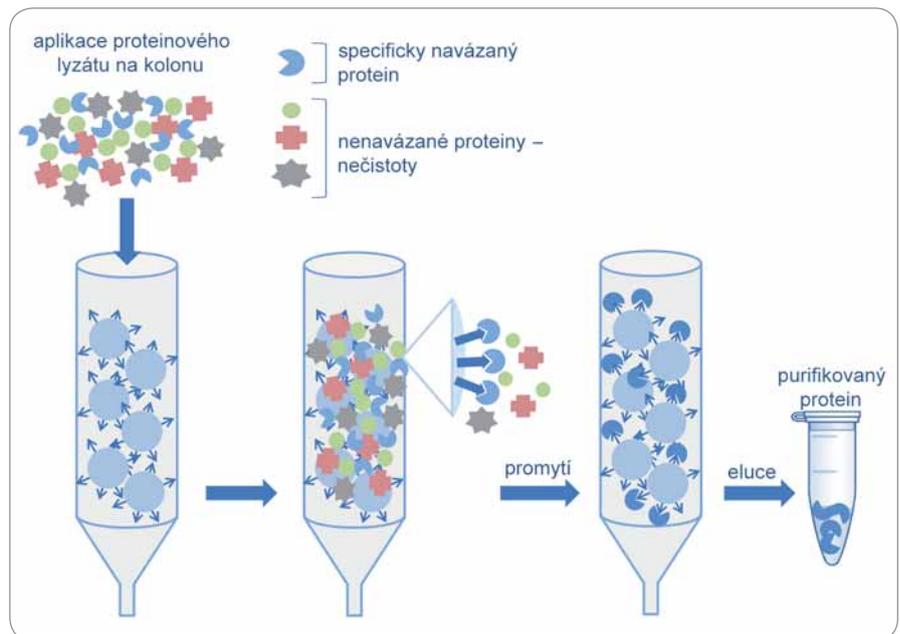
Adenovirové vektory [13] patří mezi oblíbené expresní systémy, které jsou dostupné v mnoha modifikacích metody přípravy rekombinantního virového genomu. Jedná se např. o komerčně dostupné systémy ViraPower (Life Technologies, USA), jenž je kompatibilní s klonovacím systémem Gateway, AdEasy (Agilent Technologies, USA) nebo AdenoX (Clontech, USA). Adenoviry jsou jednoduché viry s neobalenou ikozaedrální kapsidou a jejich genom je tvořen dvouřetězcovou lineární DNA.

Genom adenovirů bylo možno upravit na klonovací vektor tak, že skupiny genů rané fáze exprese *E1* a *E3* byly deletovány a na místo genů *E1* byla vložena expresní kazeta. Delecí genů *E1* a *E3* ztratil adenovirus schopnost replikace a pro vytvoření virového potomstva musí být tato funkce komplementována tzv. pomocnými buňkami. Jako pomocná linie je využívána třeba buněčná linie HEK 293, která tyto geny získala díky tomu, že byla vytvořena transformací embryonálních buněk ledvin adenovirovou DNA [14]. Pro expresi rekombinantního proteinu je vhodná jakákoli buněčná linie, jež neobsahuje geny *E1* a *E3*. Po transdukci tak nedochází k replikaci viru a následné lýze hostitelské buňky, a produkce rekombinantního proteinu proto může v buňce neomezeně probíhat.

Expresní vektory vycházející z retrovirů [15], a zejména z rodu *Lentivirus*, umožňují vkládat cizorodé geny do genomu hostitelských buněk a zajistit tak stabilní expresi rekombinantního proteinu. Retroviry jsou RNA viry, avšak v průběhu jejich životního cyklu vzniká intermediát tvořený dvouřetězcovou DNA, který je následně začleněn do genomu hostitelské buňky. Využití retrovirů a lentivirových vektorů sahá od základního výzkumu až po genovou terapii [16].

In vitro (bezbuněčná) syntéza proteinů využívá schopnost buněčných extraktů syntetizovat proteiny, neboť obsahují složky nutné pro transkripci, translaci a dokonce posttranslační modifikace. Mezi tyto složky patří hlavně RNA polymeráza, transkripční faktory, ribozomy a tRNA. Po přidání templátu (a kofaktorů a nukleotidů) je protein během několika hodin syntetizován. Přestože jsou výtěžky proteinů nízké, má tento systém několik výhod, např. pro značení proteinů modifikovanými aminokyselinami nebo pro syntézu proteinů toxických pro biologické systémy. Také odpadá zdlouhavá kultivace hostitelských organismů, což usnadňuje expresi mnoha různých proteinů zároveň (třeba pro screening mutací).

Chemická syntéza proteinů je využívána např. pro inkorporaci nepřirodních aminokyselin nebo značení proteinů na specifických místech. Syntetizovaný pro-



Obr. 2. Schéma afinitní purifikace.

V prvním kroku afinitní purifikace je proteinová směs nanesena na kolonu, kde se cílový protein specificky a reverzibilně váže na ligandy zachycené na chromatografické matici. V další fázi jsou během promývacího kroku nenavázané proteiny odmyty. Cílový protein je poté uvolněn změnou podmínek prostředí, tak aby bylo preferováno uvolnění komplexu protein-ligand.

tein je velmi čistý, ale metoda je limitována počtem aminokyselin, nízkým výtěžkem a rovněž vysokými náklady.

Metody purifikace proteinů

Proces purifikace je výrazně usnadněn, pokud je cílový protein opatřen afinitní značkou. Prvním krokem je v tom případě afinitní chromatografie, při níž je protein díky své afinitní značce specificky zachycen na chromatografické koloně. Nenavázané proteiny jsou v promývacím kroku odmyty a čistý protein uvolněn specificky přidáním kompetitivního ligandu nebo nespecificky změnou pH, iontové síly či polaritě (obr. 2).

Purifikační metoda je určena výběrem afinitní značky, tagu. Tyto afinitní tagy umožňují použití univerzálních purifikačních metod, neboť na chromatografické koloně je protein zachycen právě svou afinitní značkou. Mezi nejpožívanější afinitní značky patří glutathion S-transferáza (GST) [17] a polyhistidin (His6) [18], dále se využívají např. Strep-tag [19], SBP-tag (streptavidin binding peptide) [20] a MBP-tag (maltose binding protein) [21]. GST-tag je protei-

nová afinitní značka o velikosti 27 kDa, což může negativně ovlivňovat hladinu exprese rekombinantních proteinů. Na druhou stranu však byl pozorován pozitivní vliv na solubilitu některých rekombinantních proteinů [22]. Vazebná kinetika GST-tagu ke glutathionové chromatografické matici je pomalá, a proto se prodlužuje nanášení vzorku na kolonu, což je limitující faktor pro purifikaci proteinu z velkých objemů. His-tag je naopak velmi malý, neovlivňuje sekundární strukturu rekombinantních proteinů a jeho vazba ke chromatografické matici IMAC (immobilised metal affinity chromatography) je rychlá, avšak méně specifická než v případě GST-tagu. Pro dosažení vysoké čistoty proteinu je často využíváno tandemové zařazení afinitních značek pro purifikaci ve dvou následných krocích. Přítomnost afinitní značky může v mnoha směrech ovlivnit vlastnosti rekombinantního proteinu, a proto se hojně využívá jeho enzymatického odštěpení. Na trhu je k dispozici několik proteáz (např. TEV proteáza, PreScission proteáza, Enterokináza, Faktor Xa nebo trombin), jejichž cílové roz-

poznávací sekvence mohou být vloženy mezi afinitní značku a vlastní protein. Štěpení může být provedeno v roztoku proteinu, nebo přímo na chromatografické koloně. Proteáza může být také označena afinitní značkou a po ukončení inkubace spolu s odštěpenou značkou odstraněna na chromatografické koloně.

V případě nedostatečné čistoty proteinu po afinitní purifikaci je možné zahrnout dodatečné purifikační kroky, které separují proteiny podle specifických vlastností. Metoda gelové filtrace (GF) dokáže separovat molekuly podle velikosti, hydrofobní interakční chromatografie (HIC) a reverzně fázová chromatografie (RPC) podle rozdílů jejich hydrofobicity, iontově výměnná chromatografie (IEX) podle povrchového náboje nebo chromatofokuse podle izoelektrického bodu.

Metoda afinitní chromatografie, která využívá schopnosti bakteriálních receptorů nazvaných Protein A a Protein G vázat imunoglobuliny, začala být intenzivně používána po objevu technologie přípravy monoklonálních protilátek. Tato technologie umožňuje vytvoření stabilních fúzních buněčných linií, jež produkují jeden typ selektované protilátky [23]. Tak bylo získáno velké množství specifických protilátek, které se následně staly významným nástrojem pro vědu i farmaceutický průmysl.

Závěr

Díky neustále se zvyšujícím požadavkům na kvalitu i kvantitu purifikovaných proteinů a také na zjednodušení a zrychlení procesu jejich přípravy dochází k dynamickému rozvoji technologií pro expresi a purifikaci rekombinantních

proteinů. Široká škála expresních systémů využívajících prokaryotické i eukaryotické produkční organizmy umožňuje zvolit systém pro produkci proteinu splňujícího požadovaná kritéria. Při výběru vhodného expresního systému je potřeba zohlednit několik faktorů. V první řadě záleží na tom, zda je zvolený protein eukaryotického nebo prokaryotického původu. V případě exprese savčího proteinu v expresních systémech jiných organismů musíme počítat s rizikem nesusolubility proteinu a možností odlišných nebo dokonce chybějících posttranslačních modifikací. Dále je potřeba zvážit požadované množství purifikovaného proteinu, časovou náročnost metody, finanční hledisko a v případě virových expresních systémů také legislativní a bezpečnostní požadavky.

Literatura

1. Porath J, Flodin P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* 1959; 183(4676): 1657–1659.
2. Raymond S, Weintraub L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* 1959; 130(3377): 711.
3. Curtain CC. Chromatography of proteins and peptides on diethylaminoethyl methacrylate gels. *Anal Biochem* 1963; 6: 512–519.
4. Hjerten S. The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles. *Biochim Biophys Acta* 1964; 79: 393–398.
5. Weetall HH. Preparation and characterization of an arylsulphatase insolubilized on porous glass. *Nature* 1971; 232(5311): 473–474.
6. Axén R, Porath J, Ernback S. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* 1967; 214(5095): 1302–1304.
7. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69(10): 2904–2909.
8. Lobban PE, Kaiser AD. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J Mol Biol* 1973; 78(3): 453–471.

9. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70(11): 3240–3244.
10. Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 913–949.
11. Wacker M, Linton D, Hitchen PG et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 2002; 298(5599): 1790–1793.
12. Valderrama-Rincon JD, Fisher AC, Merritt JH et al. An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 2012; 8(5): 434–436. doi: 10.1038/nchembio.921.
13. Berkner KL. Expression of heterologous sequences in adenoviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 158: 39–66.
14. Graham FL, Smiley J, Russell WC et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36(1): 59–74.
15. Stephenson JR, Khan AS, van de Ven WJ et al. Type C retroviruses as vectors for cloning cellular genes with probable transforming function. *J Natl Cancer Inst* 1979; 63(5): 1111–1119.
16. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288(5466): 669–672.
17. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988; 67(1): 31–40.
18. Hochuli E. Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Genet Eng (NY)* 1990; 12: 87–98.
19. Schmidt TG, Skerra A. One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the “Strep tag” and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* 1994; 676(2): 337–345.
20. Keefe AD, Wilson DS, Seelig B et al. One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr Purif* 2001; 23(3): 440–446.
21. Chen GQ, Gouaux JE. Overexpression of bacterio-opsin in *Escherichia coli* as a water-soluble fusion to maltose binding protein: efficient regeneration of the fusion protein and selective cleavage with trypsin. *Protein Sci* 1996; 5(3): 456–467.
22. Braun P, LaBaer J. High throughput protein production for functional proteomics. *Trends Biotechnol* 2003; 21(9): 383–388.
23. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517): 495–497.
24. Hunt I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expr Purif* 2005; 40(1): 1–22.

Kvantitativní hmotnostní spektrometrie a její využití v onkologii

Quantitative Mass Spectrometry and Its Utilization in Oncology

Hernychová L., Dvořáková P., Michalová E., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Nádory jsou geneticky a klinicky velmi různorodá onemocnění, a proto se v poslední době řada proteomických studií zabývá hledáním biomarkerů, které by usnadnily prognostiku, diagnostiku či léčbu onkologických onemocnění. Účinným nástrojem je hmotnostní spektrometrie umožňující identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci biomolekul v komplexních biologických vzorcích. Prvním krokem vedoucím k selekci biomarkerů je tzv. discovery proteomika, jejímž cílem je detailní analýza vzorků směřující ke zmapování a porovnání přítomných proteinů a výběru vhodných kandidátů na potenciální biomarkery. V dalším kroku proteomické analýzy probíhá verifikace vybraných biomarkerů tzv. cílenou (targeted) proteomikou, jejímž úkolem je ověření přítomnosti a kvantity daného proteinu v analyzovaných, přesně klinicky definovaných vzorcích. Předložený článek je zaměřen na popis různých typů metod vhodných pro kvantitativní analýzu proteinů využívající hmotnostní spektrometrii.

Klíčová slova

kvantitativní proteomika – hmotnostní spektrometrie – protein – biomarker – onkologie – nádor

Summary

Cancers are genetically and clinically very heterogeneous diseases; therefore, various proteomic studies have been trying to find biomarkers which can facilitate prognosis, diagnosis or treatment of these oncological diseases. The mass spectrometry is an effective tool for identification, quantitation, and characterization of biomolecules in the complex biological samples. The first step suitable for selection of biomarkers called discovery proteomics provides a detailed analysis of the samples contributing to the identification of proteins, comparison of their presence in the samples, and selection of the convenient candidates for the prospective biomarkers. The next step of proteomics analysis is directed towards verification of chosen biomarkers with the approach called targeted proteomics. This technique evaluates presence and quantity of the proteins (biomarkers) in clinically precisely defined samples. This article focuses on the description of various approaches suitable for the quantitative analysis of the proteins connected with mass spectrometry.

Key words

quantitative proteomics – mass spectrometry – protein – biomarker – oncology – cancer

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: lenka.hernychova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 20. 1. 2014

Přijato/Accepted: 7. 4. 2014

Úvod

Hmotnostní spektrometrie je jedním z proteomických nástrojů umožňujících identifikovat, kvantifikovat a charakterizovat proteiny v komplexních biologických vzorcích. Vývoj proteomických přístupů začínal identifikací vybraných purifikovaných proteinů a verifikací genomických dat a přes komparativní proteomové analýzy se rozvinul až po charakterizaci posttranslačních modifikací proteinů, jejich dynamických změn a protein-proteinových interakcí.

V současné době jsou výsledky hmotnostně spektrometrických analýz dále rozšířeny o predikované bioinformatické údaje, které jsou teprve následně experimentálně ověřovány. Mezi bioinformatické nástroje patří programy předpovídající lokalizaci proteinu v eukaryotické nebo prokaryotické buňce (program PSORT [1]), jeho funkci (programy COG [2], KEGG [3], DAVID [4]), součinnost s ostatními proteiny či ligandy, zapojení v signálních dráhách anebo jeho úlohu v biologickém celku např. v rámci buňky (programy IPA [5], PathVisio [6]). Je známo, že mutace proteinu způsobená třeba záměnou aminokyseliny či přítomností/ztrátou posttranslačních modifikací může způsobit chybné sbalování proteinu a tím ovlivnit jeho funkci. Ta se dále může projevit změnami v interakci proteinu a narušení buněčné signalizace vedoucí k změnám v proliferaci buněk, apoptóze či nekróze. Vzhledem k tomu, že tyto faktory přispívají ke vzniku nádorově transformovaných buněk, budeme se v další části této práce detailněji zabývat metodami vhodnými ke studiu kvantitativních změn proteinů, detekcí a charakterizací posttranslačních modifikací proteinů a jejich interakcí s ligandy. Všechny uvedené metody mají společný jmenovatel, kterým je hmotnostní spektrometrie.

Jaké biologické materiály lze analyzovat?

Proteomové analýzy lze aplikovat na všechny typy biologických materiálů, které však musí být přesně klinicky vymezeny a definovány. Pro srovnávací proteomové analýzy se pak vždy definují experimentální skupiny analyzovaných vzorků, mezi nimiž se hledají rozdíly

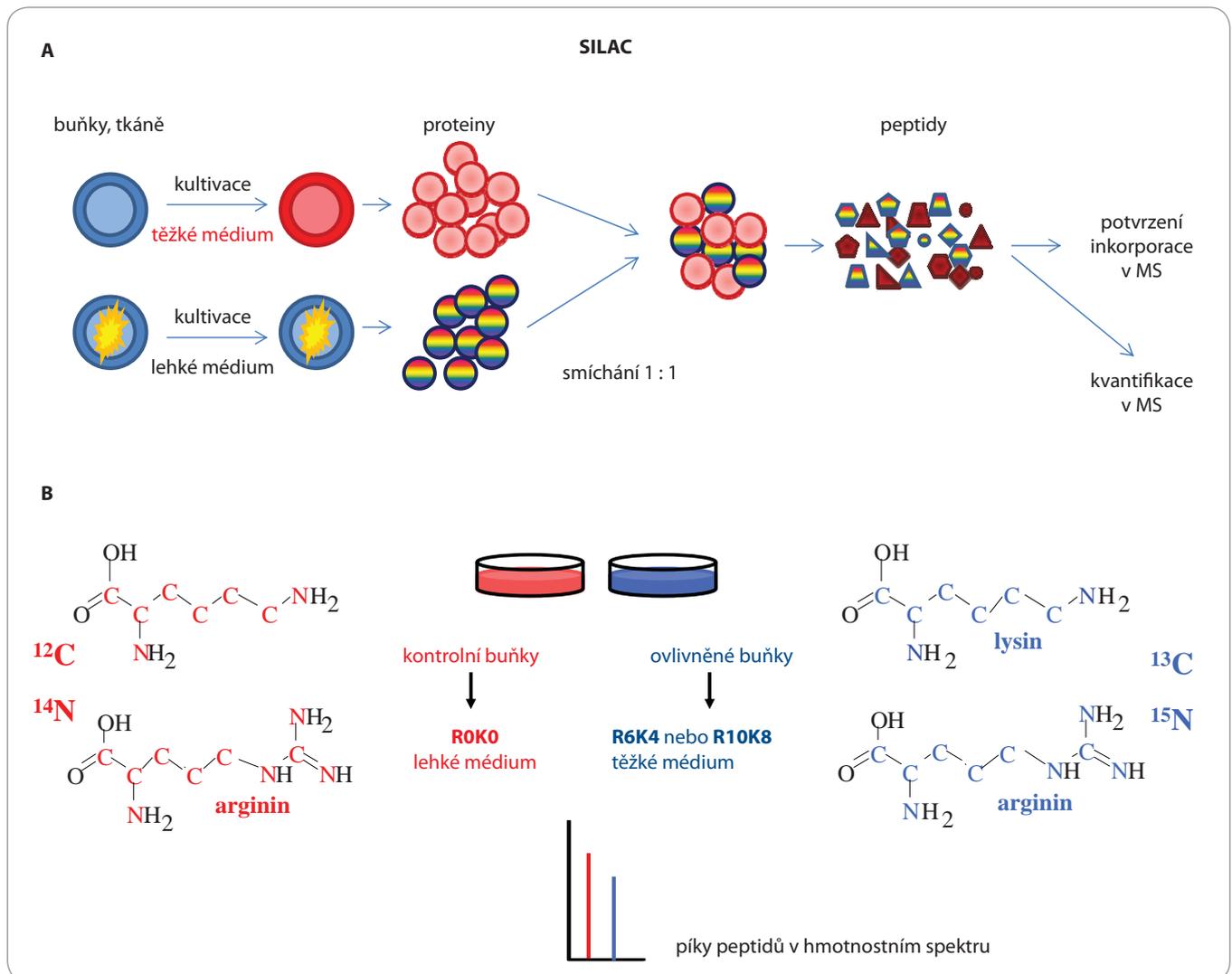
na proteinové úrovni. K nejčastěji analyzovaným klinickým biologickým materiálům patří tkáň, tělní tekutiny (moč, mozkomíšní nebo ascitická tekutina), krev (sérum, plazma), v případě laboratorních experimentů se pak používají buněčné linie či rekombinantní proteiny. Komplexita biologického materiálu představuje pro proteomickou analýzu vždy velký problém. Proto hmotnostně spektrometrické analýze předchází separační metody schopné materiál frakcionovat, a snížit tak jeho komplexitu. Je tedy výhodné předem určit skupiny proteinů např. se stejnou lokalizací v buňce nebo funkcí či strukturními motivy (membránové, jaderné, fosforylované, glykosylované proteiny) a účel, který má analýza splnit (identifikace, kvantifikace proteinů, určení místa posttranslační modifikace či změny proteinové konformace). Z těchto požadavků následně vychází vlastní protokol zpracování vzorků, který analýzu maximálně zjednoduší, avšak bez ztráty požadovaných informací.

Kvantifikace proteinů

S technologickým pokrokem lze již nyní identifikovat a kvantifikovat tisíce proteinů v jednom hmotnostně spektrometrickém měření, a to i z velmi omezeného množství výchozího materiálu (koncentrace proteinů se pohybuje v rozmezí 10–100 mg/ml). Samotná kvantifikace změn na proteinové úrovni poskytuje řadu informací o stavu biologického systému v čase nebo za definovaných biologických podmínek, jež přispívají k objasnění biochemických a fyziologických mechanismů na molekulární úrovni. V proteomických přístupech se v poslední době začaly používat subproteomové analýzy, které jsou schopné podat podrobnější informace o proteinovém složení ve vybrané izolované frakci analyzovaného materiálu, jež se při globální proteomové analýze nerozděleného vzorku ztrácí. Mezi subproteomové analýzy patří např. analýza membránových proteinů (membranom), imunoreaktivních proteinů (imunom), proteinů s proteolytickou aktivitou (proteazom), fosforylovaných či glykosylovaných proteinů (fosfoproteom či glykoproteom).

Kvantifikace proteinů může probíhat ve dvou základních uspořádáních.

V prvním případě lze porovnávat kvantitu proteinů dvou či více biologických systémů (relativní kvantifikace), ve druhém uspořádání je možné přímo určit koncentraci daného proteinu v analyzovaném vzorku (absolutní kvantifikace). Přístupy používané pro relativní kvantifikace se dají rozdělit do dvou skupin: 1. metody závislé na izotopovém značení (label-based) a 2. nezávislé na značení (label-free). Důležitým požadavkem u metod závislých na značení je jasné oddělení značených peptidů/proteinů od neznačených. Mezi často využívané metody závislé na izotopovém značení patří stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) postup [7], který lze aplikovat pouze na živé organizmy *in vitro*, *in vivo* nebo *ex vivo*. Ke značení se používají stabilní izotopy neradioaktivních těžkých aminokyselin, jež jsou v průběhu metabolického procesu (např. při kultivaci buněčných kultur) inkorporovány do nově syntetizovaných proteinů. Ve standardním experimentálním uspořádání jsou kontrolní a ovlivněné buňky (např. normální a nádorové buňky) kultivovány v lehkém a těžkém kultivačním médiu lišící se přítomností neznačených aminokyselin, např. arginin, lysin (lehké médium), a stejných značených aminokyselin (těžké médium), které obsahují izotopy ^{13}C a/nebo ^{15}N . Po kontrole inkorporace těžkých aminokyselin do proteinů buněk kultivovaných v těžkém médiu jsou z obou buněčných linií izolovány proteiny, smíchány v poměru 1 : 1, proteolyticky štěpeny a analyzovány na hmotnostním spektrometru tzv. shotgun postupem (obr. 1A). Na základě hmotnostních spekter jsou pak identifikovány píky stejných peptidů lišících se přesně definovanými hmotnostními posuny jejich efektivních hmot (m/z) a z poměrů ploch pod těmito píky (resp. jejich intenzit) je odečítána relativní kvantifikace (obr. 1B). Identifikace proteinů je potom odvozena z fragmentačních spekter. Výhody tohoto postupu lze shrnout do následujících bodů: 1. získání dostatečného množství značeného materiálu pro další analýzy bez variací v účinnosti značení mezi jednotlivými vzorky (dochází vždy ke stejné inkorporaci těžkých aminokyselin), 2. možnost sledování proteinových změn v čase

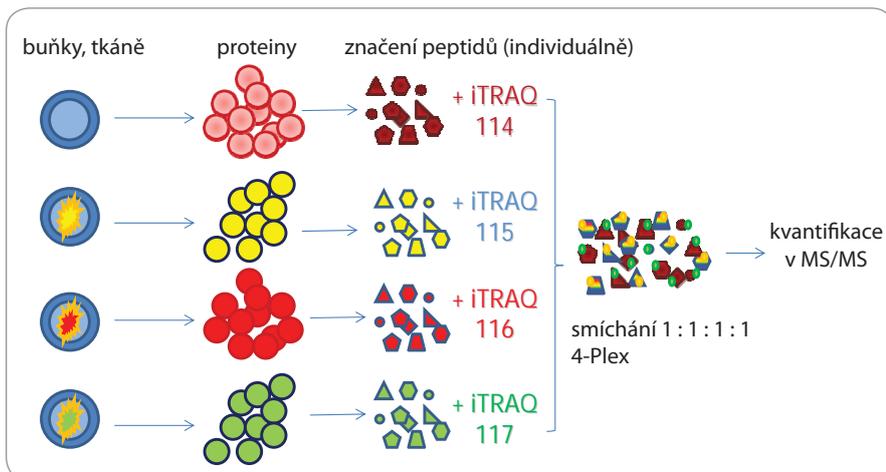


Obr. 1. A. Schematický postup popisující SILAC kvantitativní analýzu buněčných linií. B. Struktura těžkých a lehkých aminokyselin zastoupených v kultivačních médiích a jejich efekt (specifický hmotnostní posun) v hmotnostním spektru, v němž osa x představuje efektivní hmoty (m/z) iontů peptidů a osa y intenzitu iontů, která odpovídá kvantitativnímu zastoupení daného peptidu v analyzovaném vzorku.

a 3. od izolace proteinů, kdy jsou vzorky smíchány 1 : 1, jsou všechny další úkony se značeným a neznačeným vzorkem prováděny stejně (nedochází k variabilitám způsobeným přípravou vzorků pro MS analýzu). Velká nevýhoda postupu je však vysoká finanční i časová náročnost, možnost porovnání nejvýše tří různých stavů a nemožnost aplikace na lidské vzorky tkání. V hmotnostních spektrech často dochází k překryvu peptidových píků a výskytu satelitních píků vlivem metabolické konverze [8,9], což způsobuje problémy v interpretaci spekter, a tím i samotnou kvantifikaci proteinů.

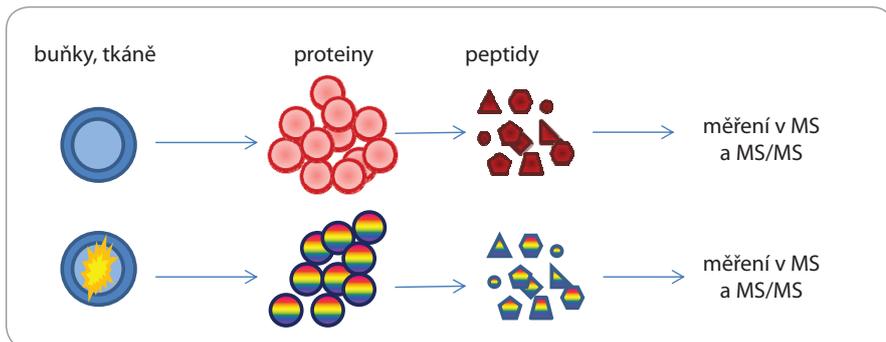
Selekce biomarkerů analýzou sér či tkání pacientů výše popisovaným postupem je náročné z hlediska dostupnosti a variability vzorků. Proto analýzy nádorových buněčných linií byly využívány jako výhodná alternativa pro zjištění biologicky zajímavých molekul, které jsou pak verifikovány na vzorcích pacientů. Jedním z příkladů je práce Geigera et al [10], v níž byly použity definované buněčné linie odvozené z různých stadií karcinomu mléčné žlázy. Metodou SILAC byly identifikovány biomarkery mitochondriální matrix protein isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2), cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2)

a alpha-tocopherol-associated protein (SEC14L2), jež byly validovány cílenou hmotnostně spektrometrickou analýzou a imunohistochemicky na vzorcích tkání pacientek. Tyto proteiny se ukázaly být vhodnými biomarkery pro monitorování progresu a prognózy karcinomu mléčné žlázy. SILAC technika byla také použita *in vivo* – experimentální myši byly krmeny granulemi obsahujícími lysin se stabilním izotopem ^{13}C nebo řasu spirulinu se stabilním izotopem ^{15}N [11]. Všechny nově syntetizované proteiny byly označeny a mohly být na proteomové úrovni porovnávány s kontrolními neznačenými vzorky. Tohoto modelu lze využívat pro



Obr. 2. Postup značení a kvantitativní analýzy proteinů ze čtyř vzorků připravených z různých biologických stavů buněčné linie.

Peptidy jsou značeny iTRAQ značkami, jejichž reportérová část vykazuje hmoty m/z 114–117, které se objeví ve fragmentačním spektru daného peptidu. Intenzita jejich píků pak bude odpovídat kvantitativnímu zastoupení peptidů v různých vzorcích.



Obr. 3. Postup kvantifikace proteinů proteomickými metodami bez použití značení.

Z biologického materiálu jsou izolovány proteiny, které jsou proteolyticky štěpeny enzymem a měřeny hmotnostním spektrometrem. Z intenzit peptidových píků v MS spektrech jsou odečítány kvantitativní poměry peptidů, následně z fragmentačních MS/MS spekter jsou určeny aminokyselinové sekvence těchto peptidů.

monitorování funkcí genů u knockout myši. Vylepšenou verzí SILAC metody je super-SILAC postup [12], který se snaží řešit problém heterogenity nádorových tkání a značení proteinů (nelze kultivovat v těžkém médiu). Z tohoto důvodu byl problém elegantně vyřešen přidáním SILAC značených proteinů získaných buněčných linií do lyzátu analyzované tkáně. Boersema et al [13] použili tuto metodu pro identifikaci N-glykosylovaných proteinů přítomných v sekretu buněčných nádorových linií a vzorcích krve pacientů. Do 11 buněčných linií odvozených z karcinomu mléčné žlázy přidali interní standard představující značené proteiny reprezentující

tzv. super-SILAC mix, který umožnil kvantifikaci proteinů v analyzované tkáni. Proteom obohacený o N-glykoproteiny byl analyzován hmotnostně spektrometrickými metodami. Následně byla přítomnost proteinů identifikovaných v tkáni validována ve vzorcích lidské krve. Další populární postupy používané v relativní kvantifikaci jsou založeny na značení peptidů proteolyticky štěpených proteinů. Jako příklad lze uvést isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ, obr. 2 [14]) nebo tandem mass tag (TMT [15]). Jedná se o chemické značení primárních aminů peptidů, k nimž je připojena molekula reagentu složená ze tří skupin (reportérová, vyrovná-

vací a reagující s peptidem). Hmotnostní rozdíly molekuly reagentu jsou ovlivněny začleněním izotopů atomů ^{13}C , ^{15}N a ^{18}O a tím umožňují hmotnostní posuny píků značených peptidů ve spektrech. Výhoda přístupu je, že lze značit až osm různých biologických stavů a jejich kvantifikaci odečítat najednou z jednoho spektra a identifikovat proteiny přítomné ve vzorku v rozdílné koncentraci (široký dynamický rozsah). Další výhodou je současná identifikace a kvantifikace proteinů v jednom měření ve fragmentačních spektrech. Nevýhodou metody je možné zkreslení informace o kvantitě proteinů ve vzorcích z důvodu značení peptidů až po proteolytickém štěpení proteinů, neboť před tímto krokem se manipulovalo se vzorky odděleně. Tuto metodu použili Rehman et al [16] pro identifikaci potenciálních prognostických biomarkerů nádoru prostaty spojených s progresí onemocnění a metastazováním. K analýze použili buněčné linie odvozené od nádoru prostaty a směsné vzorky sér pacientů. Protein eukaryotického translation elongation factor 1 alpha 1 (eEF1A1) byl identifikován jako nový kandidátní biomarker se signifikantně zvýšenou expresí u pacientů zařazených do studie. V jiné studii zaměřené na analýzu fosforylace na tyrozinu v immortalizované buněčné lince odvozené z epiteliálních buněk mléčné žlázy MCF-10A bylo identifikováno 57 unikátních proteinů zahrnujících tyrozinové kinázy, fosfatázy a proteiny účastnící se buněčné signalizace. Poprvé byly identifikovány proteiny SLC4A7 (sodium bicarbonate cotransporter) a TOLLIP (toll interacting protein) jako nové tyrozin kinázové substráty spojené s vývojem karcinomu mléčné žlázy [17].

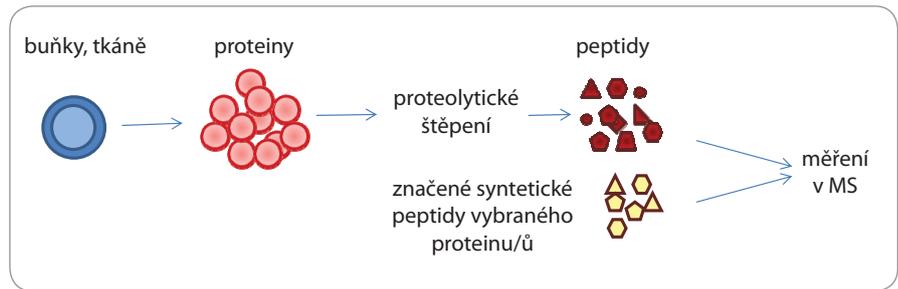
U label-free postupu nejsou vzorky značeny žádnými značkami [18]. Metoda je rychlá, cenově dostupná, avšak méně přesná a nevhodná pro proteiny přítomné ve vzorcích v nízkých koncentracích. Další problém je náročné hodnocení hmotnostně spektrometrických dat, pro něž musí být použity vysoce sofistikované programy. V průběhu přípravy i měření se pracuje se vzorky odděleně, ale za stejných experimentálních podmínek (obr. 3). Předností je analýza neomezeného počtu vzorků, které

mohou být mezi sebou porovnávány. Informace o kvantitě jsou získávány: 1. z intenzit píků peptidových iontů či ploch pod píky v hmotnostních spektrech nebo v chromatogramech nebo 2. z počtu MS/MS spekter přiřazených danému peptidu/proteinu nazývané spectral counting. Empiricky bylo zjištěno, že peptidy přítomné ve vzorcích ve vyšších koncentracích vykazují častější výskyt iontů v hmotnostních spektrech.

V případě absolutní kvantifikace musí být již známy proteiny/peptidy, které ve vzorcích chceme cíleně kvantifikovat. Absolutní kvantifikaci tedy musí předcházet tzv. discovery analýza vzorku. Aminokyselinová sekvence proteinu či jeho části je pak syntetizována a je obohacena o značku, která umožní jeho odlišení v hmotnostních spektrech od nativního proteinu. Syntetický konstrukt je přidáván do vzorku v několika známých koncentracích pokrývajících předpokládanou koncentraci nativního proteinu. Koncentrace nativního proteinu je pak odvozena porovnáním intenzit píků syntetického konstruktů a nativního peptidu v hmotnostních spektrech (obr. 4).

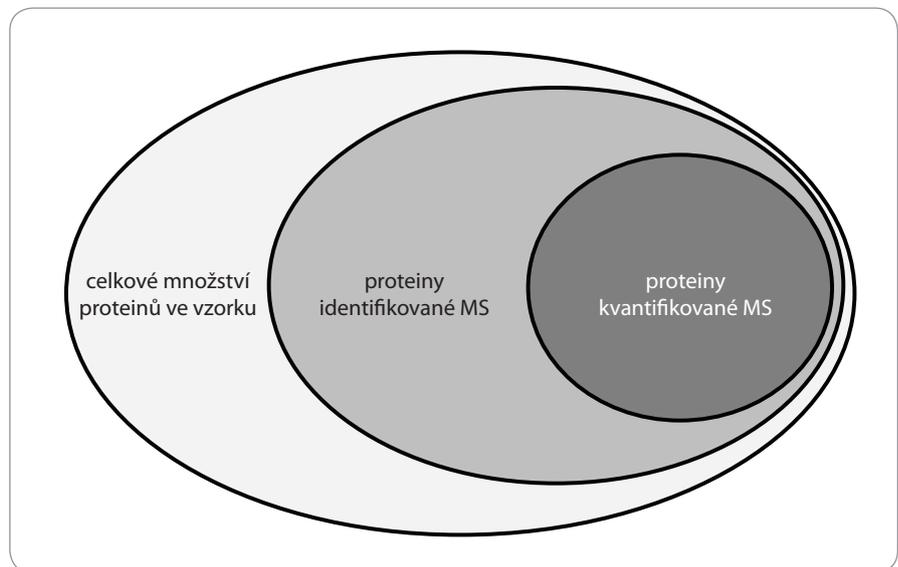
Závěr

Všechny popisované metody však mají stále svá omezení vedoucí ke kvantifikaci jen určité části proteinů přítomných ve vzorku (obr. 5). Limitujícími jsou metodické i technologické faktory. Z hlediska metodiky často dochází při přípravě vzorků ke ztrátám části analyzovaného materiálu a v případě technologie (např. hmotnostní spektrometr) stále není dostačující přístrojové vybavení pro zachycení iontů všech proteinových komponent přítomných v analyzovaném vzorku. V návaznosti na tento proces je nutný i vývoj zpracování a vyhodnocení obsáhlých dat získaných z hmotnostních spektrometrů. Firmy i akademická pracoviště investují nemalé úsilí do vývoje dokonalejších algoritmů schopných zpracovat obrovské množství informací tak, aby se k uživateli dostaly ve formě snadno interpretovatelných výsledků. Cílem proteomiky je systematická kvantifikace proteinů v buňkách nebo tkáních, a tím sledování změn mezi různými biologickými stavy, např. zdravý vs nemocný. Detekce těchto



Obr. 4. Schematické znázornění absolutní kvantifikace proteinů v komplexním biologickém vzorku.

Proteiny izolované ze vzorku jsou proteolyticky štěpeny enzymem na peptidy. Do peptidové směsi jsou ve známých koncentracích přidány syntetické značené peptidy a celá směs je pak analyzována hmotnostním spektrometrem. Porovnáním intenzit píků syntetického a nativního peptidu je pak vypočítána koncentrace nativního peptidu.



Obr. 5. Znárodnění počtu kvantifikovaných proteinů ve vzorcích analyzovaných proteomickými přístupy.

změn přispívá ke stanovení specifických proteinových biomarkerů, které je pak možné využít k diagnostice nebo prognostice různých typů nádorových onemocnění. V posledních letech se stále více diskutuje o personalizované léčbě, kdy by každému pacientovi mohla být ordinována účinná léčba právě na základě detekovaných biomarkerů přítomných v krvi či tkáni pacienta. Kvantifikace proteinů hmotnostní spektrometrií je metoda náročná na přípravu a zpracování vzorků a závislá na finančně nákladném přístrojovém vybavení. Není tedy vhodná pro rutinní testování vzorků odebraných pacientům v rámci jejich vyšetření. Dává však možnost primárně odhalit nové biomarkery nádorových

onemocnění a detekovat změny v biologických systémech, které jsou základem pro vývoj jednodušších a levnějších přístupů a jejich aplikací v běžné klinické praxi.

Literatura

1. Psort.hgc.jp [homepage on the Internet]. PSORT www Server. University of Tokio, Japan; c2007 [cited 2014 February 17]. Available from: <http://psort.hgc.jp/>.
2. Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(1): 33–36.
3. Genome.jp/kegg [homepage on the Internet]. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Kanehisa Laboratories, Japan; c1995–2014 [cited 2014 February 17]. Available from: <http://www.genome.jp/kegg/>.
4. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2008; 4(1): 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.

5. Hslls.pitt.edu/molbio/ipa [homepage on the Internet]. Search.HSLS.MolBio, Health Sciences Library system; c1996–2014 [cited 2014 February 17]. Available from: <http://www.hslls.pitt.edu/molbio/ipa>.
6. van Iersel MP, Kelder T, Pico AR et al. Presenting and exploring biological pathways with PathVisio. *BMC Bioinformatics* 2008; 9(1): 399. doi: 10.1186/1471-2105-9-399.
7. Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(12): 952–958.
8. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1(5): 376–386.
9. Marcilla M, Alpizar A, Paradelo A et al. A systematic approach to assess amino acid conversions in SILAC experiments. *Talanta* 2011; 84(2): 430–436. doi: 10.1016/j.talanta.2011.01.050.
10. Geiger T, Madden SF, Gallagher MW et al. Proteomic portrait of human breast cancer progression identifies novel prognostic markers. *Cancer Res* 2012; 72(9): 2428–2439. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3711.
11. Krüger M, Moser M, Ussar S et al. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* 2008; 134(2): 353–364. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.033.
12. Geiger T, Cox J, Ostasiewicz P et al. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat Methods* 2010; 7(5): 383–385. doi: 10.1038/nmeth.1446.
13. Boersema PJ, Geiger T, Wisniewski JR et al. Quantification of the N-glycosylated secretome by super-SILAC during breast cancer progression and in human blood samples. *Mol Cell Proteomics MCP* 2013; 12(1): 158–171. doi: 10.1074/mcp.M112.023614.
14. Ross PL, Huang YN, Marchese JN et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics MCP* 2004; 3(12): 1154–1169.
15. Rauniyar N, Gao B, McClatchy DB et al. Comparison of protein expression ratios observed by sixplex and duplex TMT labeling method. *J Proteome Res* 2013; 12(2): 1031–1039. doi: 10.1021/pr3008896.
16. Rehman I, Evans CA, Glen A et al. iTRAQ identification of candidate serum biomarkers associated with metastatic progression of human prostate cancer. *PLoS One* 2012; 7(2): e30885. doi: 10.1371/journal.pone.0030885.
17. Chen Y, Choong LY, Lin Q et al. Differential expression of novel tyrosine kinase substrates during breast cancer development. *Mol Cell Proteomics MCP* 2007; 6(12): 2072–2087.
18. Liu NQ, Dekker LJ, Stingl C et al. Quantitative proteomic analysis of microdissected breast cancer tissues: comparison of label-free and SILAC-based quantification with shotgun, directed, and targeted MS approaches. *J Proteome Res* 2013; 12(10): 4627–4641. doi: 10.1021/pr4005794.

Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

Analysis of Protein Using Mass Spectrometry

Dvořáková P., Hernychová L., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Rychlý rozvoj hmotnostní spektrometrie spolu s proteomickými přístupy umožňuje detailnější studium biologických systémů. Prvotní problémy hmotnostně spektrometrických analýz biologických makromolekulárních látek byly úspěšně překonány a dnes se běžně tato analytická metoda používá pro identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci proteinů. Cílem článku je podat přehled o možnostech analýzy proteinů s využitím hmotnostní spektrometrie. Popisujeme různé typy ionizace a výběr analyzátorů pro hmotnostně spektrometrické měření proteinů, rovněž i on-line či off-line spojení analýzy se separačními technikami, jako je kapalinová chromatografie a elektroforéza. Zmiňujeme se i o přípravě proteinů a způsobech analýzy biologických makromolekulárních látek pomocí hmotnostních spektrometrů. Dále jsou uvedeny možnosti hmotnostně spektrometrických analýz vzorků a zpracování naměřených dat.

Klíčová slova

hmotnostní spektrometrie – chromatografie kapalinová – elektroforéza – proteomika

Summary

Recently, mass spectrometry has become a powerful tool in cancer research. Mass spectrometry represents the method that allows identification, quantification and characterization of proteins in biological samples. Nowadays, it is mainly used for biomarker discovery that can enable early detection of cancer. This article is focused on protein analysis by mass spectrometry. At first, mass spectrometry and its importance in proteomics are described. Subsequently ionization type and mass analyzers are discussed. This relates to the possibility of on-line or off-line analysis connection with separation techniques, such as liquid chromatography and electrophoresis. Different approaches for preparing proteins and methods of analysis of biomolecules using mass spectrometers are described. In addition, the possibility of mass spectrometric analyses of samples and data processing are discussed.

Key words

mass spectrometry – liquid chromatography – electrophoresis – proteomics

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Ing. Petra Dvořáková, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: petra.dvorakova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 31. 1. 2014
Přijato/Accepted: 25. 3. 2014

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která umožňuje rozlišit ionty na základě jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z , měrná hmotnost). Původně ovšem vznikla na poli fyziky a za její počátek se považuje přelom 19. a 20. století. Jako zakladatel je uváděn fyzik J. J. Thomson a jeho zásadní práce o vychylování katodového záření v elektrickém poli [1]. Analýza malých organických látek se stala rutinní záležitostí až v 80. letech 20. století. V té době však analýza biologických makromolekulárních látek, za které jsou považovány nukleové kyseliny a proteiny, nebyla možná kvůli absenci vhodných ionizačních technik. Od 90. let došlo díky významnému pokroku v oblasti hmotnostní spektrometrie k rozvoji metod identifikace a strukturní analýzy těchto látek. Byly totiž objeveny vhodné techniky, které dokázaly účinně a jemně ionizovat tyto netěkavé makromolekuly, aniž způsobovaly jejich fragmentaci. Za vývoj těchto ionizačních technik byla jejich objevitelům Johnu B. Fennovi [2] a Koichi Tanakovi [3] udělena v roce 2002 Nobelova cena za chemii.

Od té doby se hmotnostní spektrometrie začala v biologických sférách stále více uplatňovat. V posledních 10 letech se pak stala významným nástrojem biologického výzkumu především

jako metoda identifikace, charakterizace a kvantifikace proteinů a metabolitů. V analýze proteinů se hmotnostní spektrometrie používá především pro kontrolu kvality rekombinantních proteinů a ostatních makromolekul, k identifikaci proteinů v biologických látkách, hledání biomarkerů pro daná onemocnění a pro detekci a charakterizaci posttranslačních modifikací.

Ionizace a analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

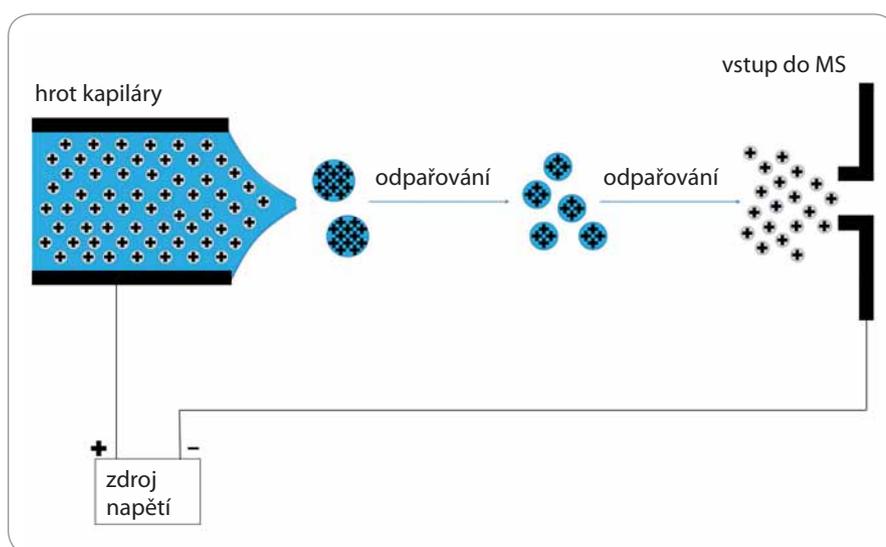
Každý hmotnostní spektrometr (mass spectrometer – MS) se skládá z ionizačního zdroje, hmotnostního analyzátoru dělicího ionizované analyty dle jejich m/z a z detektoru.

Nejprve je nutné převést analyty pomocí vhodné ionizační techniky na ionty. Pro ionizaci biologických makromolekulárních látek se používají tzv. měkké ionizační techniky, které nezpůsobují jejich fragmentaci. Běžně se setkáváme s ionizací pomocí laseru za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization – MALDI) a ionizací elektrosprejem (electrospray ionization – ESI) či nanosprejem (nanoESI) [4]. Při MALDI ionizaci je vzorek nanesen na MALDI destičku a smíchán s vhodnou matricí (pro peptidy se používá např. α -kyano-4-hydroxy-

roxyskořicová kyselina, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina a pro proteiny kyselina sinapová) a ponechán společně krystalizovat. Poté je destička se vzorky umístěna do vakuované části MS. Proces ionizace je uskutečněn krátkými laserovými pulzy, kdy energie záření laseru je pohlcena matricí, což vede k jejímu rychlému zahřátí a následné desorpci včetně iontů analytu. Při tomto procesu dochází ke vzniku převážně jednonásobně nabitých iontů [5]. ESI ionizuje analyty v roztoku, tudíž je obvykle spojován on-line se separačními technikami, např. s kapalinovou chromatografií (liquid chromatography-ESI – LC-ESI) či kapilární elektroforézou (capillary electrophoresis-ESI – CE-ESI). Při ionizaci ESI je na hrot sprejovací kapiláry přivedeno vysoké napětí (2–6 kV) [5], čímž dochází k vytvoření nabitých kapiček analytu obalených rozpouštědlem. V důsledku postupného odpařování rozpouštědla se postupně uvolní vytvořené ionty, které jsou elektricky usměrňovány na vstup do MS (obr. 1). Tato ionizační technika produkuje vícenásobně nabité ionty $[M+nH]^{n+}$.

Ionty vzniklé v ionizačním zdroji jsou následně usměrňovány iontovou optikou a přechází do hmotnostního analyzátoru. Separace iontů v hmotnostním analyzátoru probíhá za vysokého vakua a je založena na různých fyzikálních principech. Iontová past (ion trap – IT), orbitrap a iontová cyklotronová rezonance (ion cyclotron resonance – ICR) patří mezi hmotnostní analyzátory, které separují ionty na základě jejich m/z rezonanční frekvence; kvadrupól (quadrupole – Q) používá stability iontů s danou m/z při aplikování konkrétních hodnot napětí na elektrody v daný časový okamžik; analyzátor doby letu (time of flight – TOF) využívá čas letu iontů [5]. Jednotlivé MS se liší technickými specifikacemi, jako je hmotnostní rozsah, rychlost analýzy, rozlišení, senzitivita či dynamický rozsah, souvisejícími s použitým hmotnostním analyzátozem; více informací lze nalézt v publikaci Holčapek et al (2012) [6].

Po separaci v hmotnostním analyzátoru dopadají ionty na detektor, který zaznamenává počet iontů pro jednotlivé m/z hodnoty. Nejčastěji se používají



Obr. 1. Elektrosprej umožňuje převedení kapalně fáze na plynnou.

Na hrot kapiláry, kterou proudí mobilní fáze s analyty, je přivedeno vysoké napětí. Dochází k vytvoření elektricky nabitých spreje. V důsledku odpařování rozpouštědla se postupně uvolňují ionty, které vstupují do MS.

elektronové násobiče, kdy ionty dopadají na povrch dynody, z níž vyrazí elektrony, které jsou systémem dynod nebo opakovanými kolizemi zesíleny. Výsledkem měření je hmotnostní spektrum, kde jsou zaznamenány jednotlivé naměřené měrné hmotnosti a jejich intenzity.

Měřeny jsou pseudomolekulární ionty $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$, kde M představuje hmotnost analytu, k níž byl připojen či z ní byl odloučen atom vodíku. Lze zvolit, zda budou měřeny kladné či záporně nabitě ionty. Pro proteiny se zpravidla volí kladný mód, záporný je používán pro speciální experimenty, jako např. pro studium vybraných posttranslačních modifikací. Měří se monoizotopická molekulová hmotnost, která představuje součet přesných hmotností „nejlehčích“ izotopů prvků, a je tedy odlišná od hmotnosti průměrné, jež je dána váženým průměrem všech izotopů daného prvku dle jejich procentuálního zastoupení.

Separáční techniky

Biologické vzorky představují komplexní směs obsahující vedle velkého množství proteinů také řadu dalších vysokomolekulárních látek, tuků a cukrů. Po odstranění těchto doprovodných látek získáme vzorek, který je bohatou směsí proteinů lišících se jak koncentrací (abundantní proteiny vs. minoritní), tak fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako polarita (hydrofilicita a hydrofobicita), velikost (molekulová hmotnost) a náboj (izoelektrický bod) apod. Těchto rozdílných vlastností se používá k rozdělení komplexní směsi proteinů na méně komplexní frakce, přičemž platí, že čím kvalitnější frakcionace, tím více proteinů může být identifikováno. Limitující je v tomto případě především koncentrace proteinu ve vzorku a dále dynamický rozsah hmotnostního analyzátoru. V proteomice existují dva hlavní široce používané typy separace. První zahrnuje solubilizaci proteinů pomocí detergentů (nejčastěji sodium dodecyl sulfate – SDS) a jejich následnou separaci gelovou elektroforézou [7]. Druhý přístup nevyužívá gel, nýbrž rozdílné distribuce látek mezi stacionární a mobilní fází, tedy chromatografické separace [8].

Gelová elektroforéza využívá pro separaci proteinů gel. Denaturované proteiny, obalené dodecylsulfátem sodným (SDS) nesoucím silný negativní náboj, jsou naneseny na gel, který je umístěn v mírně alkalickém prostředí. Po aplikaci elektrického pole proteiny začínou migrovat různou rychlostí směrem k anodě. Pohyblivost proteinů v gelu je ovlivněna jednak vlastnostmi proteinu a jednak podmínkami, za nichž separace probíhá. Mezi nejvýznamnější gelové techniky patří jednorozměrná či dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (1-DE, 2-DE) [8]. Tradiční 1-DE umožňuje za denaturačních podmínek dělit směs proteinů podle molekulových hmotností. Při 2-DE předchází výše popsané separaci dělení proteinových směsí podle izoelektrických bodů (pI) proteinů. Za výhodu zejména u 2-DE se považuje, že po rozdělení komplexního vzorku již obvykle není třeba další separační krok. Lze ji tedy spojit s instrumenty umožňujícími přímou analýzu (např. MALDI-TOF). V případě 1-DE se však vyžaduje zařazení dalšího separačního kroku – kapalinové chromatografie. Gelové techniky jsou omezeny nízkou citlivostí, linearitou, slabou rozpustností membránových proteinů a absencí nízkomolekulárních látek.

Pro chromatografickou separaci se využívá kapalinová chromatografie, kdy jsou nejprve analyty přivedeny na kolonu, která je zadržuje. Následně jsou analyty z kolony postupně vymývány vhodnou mobilní fází. Na rozdíl od gelových technik bývá kapalinová chromatografie přímo spojována s MS a to pomocí ESI [5]. Nejčastěji používanými kolonami jsou kolony s reverzní fází (RP), s kationtově výměnnou fází (strong cation-exchange – SCX), kolony založené na hydrofilní interakci (hydrophilic interaction liquid chromatography – HILIC) nebo na elektrostaticky odpuzované hydrofilní interakci (electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography – ERLIC) [9]. Jednotlivé kolony lze použít odděleně před vlastní MS analýzou (off-line separace) nebo v případě RP kolon je možné přímé spojení s MS (on-line separace). Pokud jsou vzorky velmi komplexní (např. buněčný lysát), je vhodné provést multidimenzionální

separaci tzv. MudPit strategie. Příkladem multidimenzionální separace může být rozdělení komplexního vzorku off-line na kapalinovém chromatografu pomocí SCX kolony a jeho následná analýza kapalinovým chromatografem on-line spojeným s hmotnostním spektrometrem (LC-MS) nebo tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC-MS/MS) s RP kolonou [10].

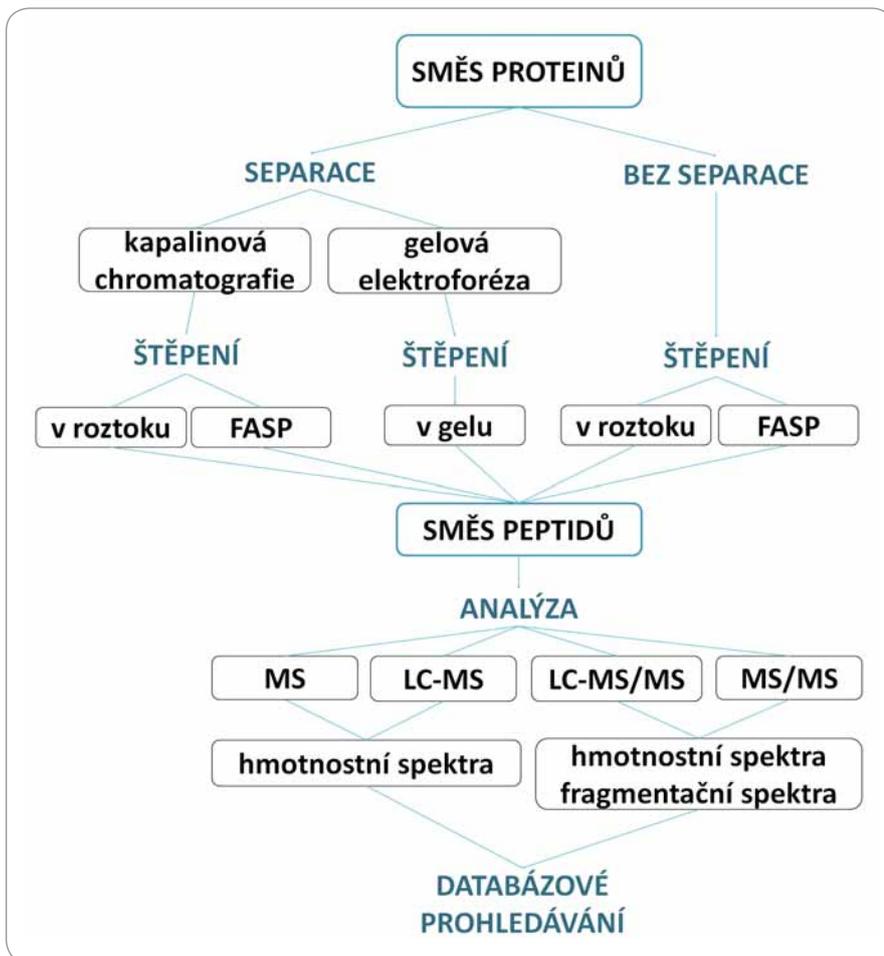
Proteomické přístupy technik zpracování proteinů

Pro identifikaci a charakterizaci proteinů pomocí hmotnostního spektrometrie se dnes využívají dva hlavní přístupy. První je enzymatické štěpení proteinů na peptidy (bottom-up) (obr. 2), tento přístup je realizován pomocí štěpení proteinu v gelu (tzv. in-gel štěpení) [11], štěpení proteinů v roztoku (in-solution štěpení) [12] či na filtrech s regenerovanou celulórou (filter-aided sample preparation – FASP) [7]. Druhý přístup je top-down analýza, kdy se vynechává proteolytické štěpení a přímo se pracuje s intaktními proteiny [13].

Bottom-up přístup

Jedná se o velmi rozšířený proteomický přístup, který je využíván pro identifikaci a kvantifikaci proteinů v komplexních biologických vzorcích. Směs proteinů je před samotným měřením na MS enzymaticky štěpena na peptidy.

Při in-gel štěpení jsou z gelu vyříznuty pásy obsahující proteiny. Pro efektivnější štěpení proteinů na peptidy je nutné rozrušení třídídimenzionální struktury proteinů, která je fixována pomocí disulfidických můstků, aby došlo k zpřístupnění maximálního počtu sterickeých míst pro následné proteolytické štěpení. Toho se dosahuje přidávkem redukčních činidel (DTT, DTE, TCEP) s následnou řízenou alkylací volných cysteinových zbytků pro zabránění opětovné tvorby disulfidických můstků vlivem vzdušné oxidace. Ke štěpení proteinů na peptidy je možné použít celou řadu enzymů, jejichž volba závisí na požadavcích kladených na výslednou peptidovou směs. Nejčastěji používanou proteázou je trypsin specificky štěpící proteiny na peptidy, které mají na C-konci zbytky bazických aminokyselin argininu nebo lysinu



Obr. 2. Schéma „bottom-up“ přístupu s použitím a bez použití separačních technik.

Více či méně komplexní směs proteinů může být štěpena v roztoku, v gelu nebo metodou FASP. Získané peptidy jsou následně buď přímo analyzovány, nebo mohou být separovány a pak analyzovány. Výsledná hmotnostní a fragmentační spektra peptidů jsou podrobena databázovému prohledávání.

(pokud za nimi nenásleduje prolin) [14]. Jedna z výhod této metody je, že při aplikování vzorku na gel dochází k částečnému odstranění případných nečistot. Naopak nevýhoda je možné zachycení peptidů v matici gelu a také problematická robotická příprava vzorků.

Metoda štěpení in-solution umožňuje štěpit komplexní směs proteinů přímo v roztoku. Pro extrakci proteinů jsou využívána silná chaotropní činidla, jako je močovina. Jedná se o metodu, která je mnohem snadněji automatizovatelná oproti in-gel štěpení. Často je následována dvoudimenzionální chromatografickou separací [7].

FASP kombinuje výhody předchozích dvou metod. Biologický vzorek je kompletně solubilizován za pomoci de-

tergentu. Následně je přenesen na filtr, čímž lze detergent vyměnit za vhodný pufr kompatibilní s proteolytickým štěpením. Protein je posléze štěpen na filtru proteázou a dochází k uvolnění peptidů [7].

Specifickou bottom-up strategií je tzv. shotgun, jehož cílem je získat co největší množství peptidů a tedy i proteinů. Proteinový lyzát bez jakékoliv frakcionace je štěpen v roztoku a následně je separován a analyzován pomocí LC-MS/MS.

Peptidy získané štěpením proteinů jsou odsoleny a zakoncentrovány, poté je lze měřit pomocí MS. Pro relativně jednoduché peptidové směsi, které vznikly štěpením jednoho či několika proteinů, se obvykle uplatňuje analýza pomocí MALDI-MS/MS. Pro měření vzorků

vzniklých štěpením komplexních proteinových směsí se pak především využívá LC-ESI-MS/MS [4,11] nebo lze zvolit i LC-MALDI-MS/MS přístup.

Top-down přístup

Jedná se přístup, který je založen na analýze proteinu či jednoduché proteinové směsi separované z komplexního vzorku bez použití enzymatického štěpení proteinů na peptidy. Obecně je analýza intaktního proteinu méně účinná než měření peptidů. Nabízí však určité možnosti nedosažitelné na úrovni peptidů. Analýzou peptidů je totiž jen zřídka docíleno kompletního pokrytí sekvence proteinů, čímž se omezuje možnost zkoumat místně specifické mutace a posttranslační modifikace jednotlivých proteinů, které mohou být důležité pro biologickou funkci [5,13]. Další výhodou této techniky je, že poskytuje přesnou molekulovou hmotnost; nicméně větší proteiny jsou převážně heterogenní, stanovení přesné molekulové hmotnosti je tedy značně obtížné.

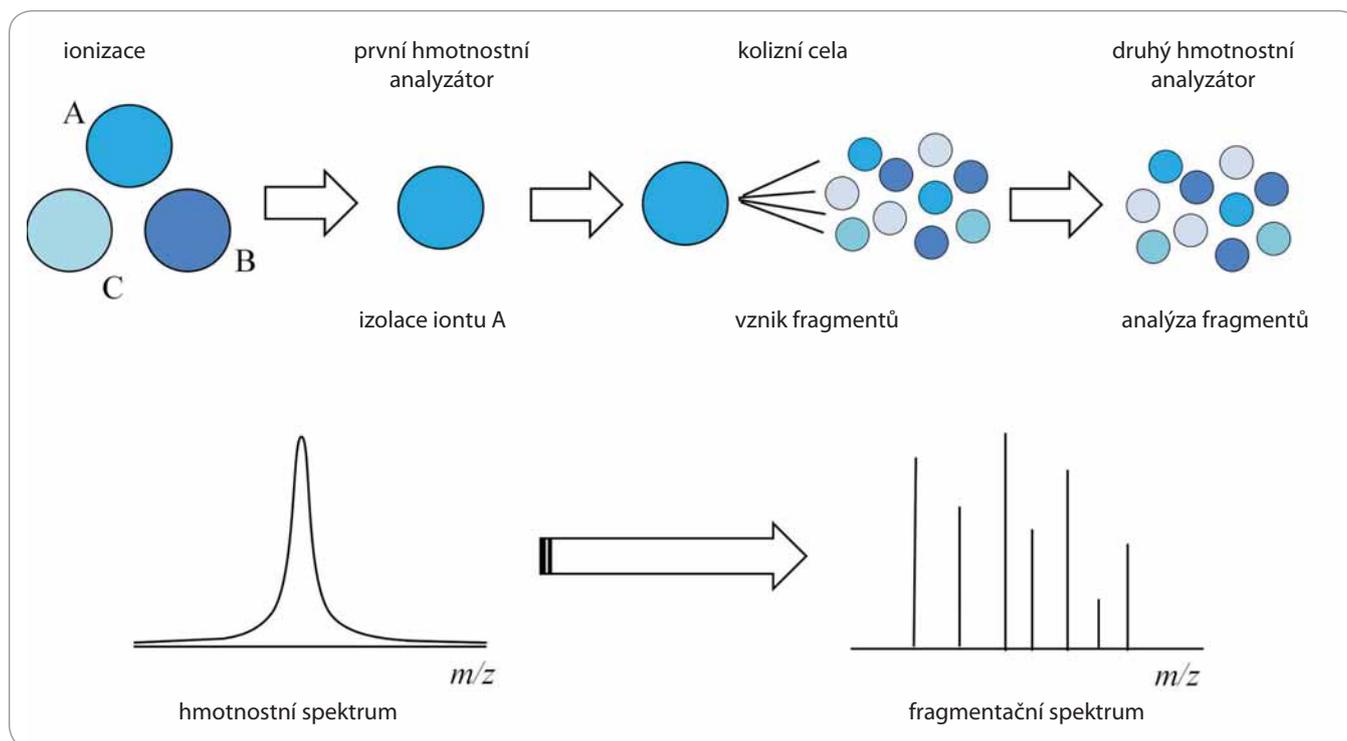
Pro analýzu proteinu je potřeba vysokorozlišovací MS s vysokou přesností měření (např. fourier transform ion cyclotron resonance – FTICR, LTQ-Orbitrap). Správná volba je použití ESI ionizační techniky, přičemž solubilizaci proteinu pro ESI lze podpořit kyselinou mravenčí [4]. MALDI ionizace má pro proteiny větší než 30 kDa obecně nízkou citlivost.

Způsoby hmotnostně spektrometrické analýzy a procesování naměřených dat

Existují dva způsoby měření peptidů a proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. První je přímé měření vzniklých peptidů, získaných štěpením proteinu z gelu. Identifikace následně probíhá metodou peptidového mapování (peptide mass fingerprinting – PMF) [15]. Druhý způsob využívá tandemové hmotnostní spektrometrie, je tedy potřeba náročnější přístrojové vybavení se dvěma analyzátoři a kolizní celou. Identifikace je uskutečněna peptidovým sekvencováním [4].

Metoda peptidového mapování

Peptidy vzniklé enzymatickým štěpením proteinu ve vzorku jsou ionizovány, separovány a detekovány pomocí MS,



Obr. 3. Při tandemové hmotnostní spektrometrii dochází k izolaci peptidu ze směsi peptidů v prvním hmotnostním analyzátoru.

Vybraný peptid je následně v kolizní cele fragmentován, vzniklé fragmenty jsou poté separovány a měřeny v druhém hmotnostním analyzátoru.

přičemž PMF bývá především spojena s přístroji typu MALDI-TOF. Získané hmotnostní spektrum peptidů představuje specifickou charakteristiku proteinu. Hodnoty m/z odečtené z hmotnostního spektra peptidů lze porovnat za pomoci speciálních vyhodnocovacích programů s teoreticky předpovězenými hmotnostmi peptidů, jež jsou obsaženy v použité databázi. Na základě shody experimentálních a teoretických databázových hodnot m/z se dá ke spektru s určitou jistotou přiřadit protein. V některých případech však není možné pouze z hmotnostního spektra peptidů protein identifikovat. V tomto případě se přistupuje k tandemové hmotnostní spektrometrii.

Tandemová hmotnostní spektrometrie

Při tandemové hmotnostní spektrometrii ionty vstupují do prvního hmotnostního analyzátoru, kde nejprve dochází k selekci a izolaci peptidového iontu ze směsi. Následně je vybraný peptidový prekurzor fragmentován v kolizní cele, vzniklé fragmenty jsou separovány a měřeny v druhém hmotnostním analyzátoru (obr. 3) a tam je naměřeno fragmentační spektrum peptidu. Fragmentace může být uskutečněna pomocí kolizní energie (collision induced dissociation – CID, popř. high energy collision induced dissociation – HCD), zachycením elektronů mnohonásobně nabitými ionty peptidů, proteinů (electron capture dissociation – ECD) nebo reakcí peptidových kationtů s fluoranthenovým aniontem (electron transfer dissociation – ETD). Peptidy obvykle bývají fragmentovány pomocí CID fragmentace [16,17]. Pro speciální aplikace např. fosfoproteomika, či kvantifikace se však uplatňuje HCD a ETD fragmentace [18]. Pro proteiny se z fragmentačních technik používá především ECD [19] nebo ETD [20,21] fragmentace.

Hmotnostně spektrometrické měření proteomických vzorků je obvykle realizováno ve způsobu data-dependent, kdy izolovány a fragmentovány jsou postupně nejintenzivnější peptidové ionty získané z předešlého MS skenu [5]. Fragmentační spektra peptidů jsou pak procesována pomocí speciálních vyhodnocovacích programů (např. Pro-

teom Discoverer, Protein Pilot). Nejvíce rozšířené je databázové vyhledávání, které experimentální hmotnostně spektrometrická data porovnává s predikovanými [16,17]. K tomuto účelu lze použít vyhledávací algoritmy, jako jsou např. Mascot, Sequest. Velmi důležité je správné zadání všech kritérií týkajících se přípravy vzorku, chemické modifikace, které se mohou vyskytovat během měření a tím modifikovat m/z hodnotu iontů (např. oxidace, acetylace, karbamidometylace), specifikace MS (např. typ fragmentace, ionizace, analyzátoru, tolerance prekurzorové a fragmentové hmoty) a vybrat databázi (např. NCBI, Swissprot) [22]. Po dokončení prohledávání je vygenerován seznam proteinů, jež byly ve vzorku nalezeny. Dále jsou zde uvedeny jiné informace, mezi něž patří např. skóre, které je vypočteno podle shodných experimentálních a teoretických hmotností peptidu, a dále také procentuální hodnocení pokrytí sekvence proteinu.

Závěr
Hmotnostní spektrometrie od svého počátku do současnosti prošla značným

teom Discoverer, Protein Pilot). Nejvíce rozšířené je databázové vyhledávání, které experimentální hmotnostně spektrometrická data porovnává s predikovanými [16,17]. K tomuto účelu lze použít vyhledávací algoritmy, jako jsou např. Mascot, Sequest. Velmi důležité je správné zadání všech kritérií týkajících se přípravy vzorku, chemické modifikace, které se mohou vyskytovat během měření a tím modifikovat m/z hodnotu iontů (např. oxidace, acetylace, karbamidometylace), specifikace MS (např. typ fragmentace, ionizace, analyzátoru, tolerance prekurzorové a fragmentové hmoty) a vybrat databázi (např. NCBI, Swissprot) [22]. Po dokončení prohledávání je vygenerován seznam proteinů, jež byly ve vzorku nalezeny. Dále jsou zde uvedeny jiné informace, mezi něž patří např. skóre, které je vypočteno podle shodných experimentálních a teoretických hmotností peptidu, a dále také procentuální hodnocení pokrytí sekvence proteinu.

Závěr

Hmotnostní spektrometrie od svého počátku do současnosti prošla značným

vývojem. V posledních letech se její těžiště přesouvá z pole chemického do biologických sfér, kde se uplatňuje při základní charakterizaci proteomu a nabízí přesnější pohled do biologických procesů buněk či organismů. Dnes používané proteomické technologie dovolují identifikovat, kvantifikovat a charakterizovat až tisíce proteinů ve vzorku. I přes neustálý pokrok je tato analytická metoda pro biologické účely omezená. Z důvodu vysoké složitosti biologického vzorku totiž není možné identifikovat všechny proteiny podílející se na procesech v buňce. V budoucnu se však dá předpokládat další rozvoj hmotnostní spektrometrie, čímž bude umožněna detailnější identifikace a charakterizace proteomů.

Literatura

1. Griffiths J. A brief history of mass spectrometry. *Anal Chem* 2008; 80(15): 5678–5683. doi: 10.1021/ac8013065.
2. Fenn JB, Mann M, Meng CK et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246(4926): 64–71.
3. Tanaka K, Waki H, Ido Y et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988; 2(8): 151–153.
4. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422(6928): 198–207.
5. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advantages, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2009; 11: 49–79. doi: 10.1146/annurev-bioeng-061008-124934.
6. Holčapek M, Jirásko R, Líska M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J Chromatogr A* 2012; 1259: 3–15. doi: 10.1016/j.chroma.2012.08.072.
7. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009; 6(5): 359–362. doi: 10.1038/nmeth.1322.
8. Monteoliva L, Albar JP. Differential proteomics: An overview of gel and non-gel based approaches. *Brief Func Genomic Proteomic* 2004; 3(3): 220–239.
9. Choi YS. Reaching for the deep proteome: recent nano liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry-based studies on the deep proteome. *Arch Pharm Res* 2012; 35(11): 1861–1870. doi: 10.1007/s12272-012-1102-y.
10. van Ulsen P, Kuhn K, Prinz T et al. Identification of proteins *Neisseria meningitidis* induced under iron-limiting conditions using the isobaric tandem mass tag (TMT) labeling approach. *Proteomics* 2009; 9(7): 1771–1781. doi: 10.1002/pmic.200800642.
11. Shevchenko A, Tomas H, Havliš J et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of protein and proteomes. *Nature Publishing Group* 2006; 1(6): 2856–2860.
12. Olsen JV, Blagoev B, Gnani F et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 2006; 127(3): 635–648.
13. Bogdanov B, Smith RD. Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24(2): 168–200.
14. Lenco J, Stulik J. Identifikace proteinů kombinací peptidového mapování a fragmentace sulfonovaných peptidů. *Chem Listy* 2004; 98: 264–267.
15. Henzel WJ, Watanabe C. Protein identification: The origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003; 14(9): 931–942.
16. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 1994; 5(11): 976–989. doi: 10.1016/1044-0305(94)80016-2.
17. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; 20(18): 3551–3567.
18. Zhang Y, Ficarro SB, Li S et al. Optimized orbitrap HCD for quantitative analysis of phosphopeptides. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009; 20(8): 1425–1434. doi: 10.1016/j.jasms.2009.03.019.
19. Zubarev RA, Kelleher NL, McLafferty FW. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *J Am Chem Soc* 1998; 120(13): 3265–3266.
20. Coon JJ, Ueberheide B, Syka JE et al. Protein identification using sequential ion/ion reactions and tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(27): 9463–9468.
21. Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ et al. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101(26): 9528–9533.
22. Casado-Vela JC, Cebrián A, Gómez del Pulgar MT et al. Lights and shadows of proteomic technologies for the study of protein species including isoforms, splicing variants and protein post-translation modifications. *Proteomics* 2011; 11(4): 590–603. doi: 10.1002/pmic.201000287.

p-SRM, SWATH a HRM – cílené proteomické přístupy na hmotnostním spektrometru TripleTOF 5600+ a jejich aplikace v onkologickém výzkumu

p-SRM, SWATH and HRM – Targeted Proteomics Approaches on TripleTOF 5600+ Mass Spectrometer and Their Applications in Oncology Research

Faktor J.^{1,2}, Michalová E.¹, Bouchal P.^{1,2}

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

Souhrn

Vývoj diagnostických a terapeutických přístupů v onkologii vyžaduje, kromě jiného, citlivé kvantitativní přístupy pro stanovení proteinů souvisejících s nádorovými procesy v klinických vzorcích. V tomto článku jsou představeny nové kvantitativní metody cílené proteomiky. Hlavní potenciál metod monitorování vybraných reakcí (SRM) a pseudo-SRM spočívá v kvantifikaci předem vybraných proteinů ve větších souborech vzorků s vysokou citlivostí a selektivitou, čímž představují alternativu ke stávajícím imunochemickým přístupům. Potenciál HRM a SWATH spočívá naopak v získávání digitálních proteomických fingerprintů, z nichž je následně možné extrahovat kvantitativní proteomická data na podobném principu jako u SRM. Článek představuje aplikace uvedených metod v řadě studií z oblasti onkologického výzkumu, kde byly použity ke stanovení a validaci stávajících i nově navrhovaných proteinových biomarkerů a při studiu jejich úlohy v mechanismu vzniku a vývoje nádorů.

Klíčová slova

proteomika – monitorování vybraných reakcí – onkologie – SWATH – biomarkery – molekulární diagnostika

Summary

Development of novel diagnostic and therapeutic approaches in cancer research requires sensitive and quantitative assays for determination of cancer-associated proteins in clinical samples. Novel quantitative targeted proteomic approaches are overviewed in this communication. A major advantage of selected reaction monitoring (SRM) and pseudo-SRM lies in the selective and sensitive quantification of selected proteins in large sample sets. As such, they represent an alternative to immunochemical approaches. On the other hand, the potential of HRM and SWATH lies in recording of digital fingerprints, which enable post-acquisition quantitative proteomic data mining on a similar basis to SRM. This article shows applications of targeted proteomics in a number of cancer research studies where they were used for quantification and validation of current or potential protein biomarkers and to study their role in cancer development and progression.

Key words

proteomics – selected reaction monitoring – oncology – SWATH – biomarkers – molecular diagnostics

Práce byla podpořena projektem Grantové agentury České republiky č. 14-19250S, Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This work was supported by the project of Czech Science Foundation No. 14-19250S, by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: bouchal@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 2. 2014

Přijato/Accepted: 26. 3. 2014

Úvod

Nové poznatky z oblasti molekulární biologie nádorů jdou ruku v ruce s vývojem nových citlivých metod, které umožňují nové analýzy na úrovni genomu, transkriptomu i proteomu a jako celek podávají komplexní obrázek o biologických procesech v buňce. Proteiny jsou nejen stavebními prvky živých organismů, ale i základními biologickými katalyzátory, regulátory a prostředníky buněčné signalizace. Hladiny proteinů, jejich modifikace a funkce se tak odrážejí v základním stavu buňky, jejích fyziologických reakcích na okolní podmínky i patologických procesech včetně maligní transformace. Rozvoj proteomických metod a současně porovnávání výsledného stavu proteomu se základní informací obsaženou v genomu a regulací exprese na úrovni transkriptomu umožňují komplexně charakterizovat biologické procesy v buňce. Charakterizace proteinů a jejich kvantifikace je tedy jedním z předpokladů rozvoje nových diagnostických a terapeutických přístupů u nádorových onemocnění založených na nově získaných systémově biologických poznatcích [1,2].

Proteomika je vědní směr, který se zabývá identifikací a kvantifikací proteinů v různých biologických systémech, a představuje tak nástroj k pochopení složitých buněčných procesů. V rámci proteomiky lze rozlišit dva základní směry: 1. tzv. necílenou proteomiku, která se zaměřuje na identifikaci nových proteinových cílů v souvislosti s určitým biologickým stavem, např. onemocněním (srovnání vzorků pacientů s dobře definovanou diagnózou a zdravých jedinců); 2. tzv. cílenou proteomiku, která se zaměřuje na jeden konkrétní protein a jeho biologickou úlohu. Pro rozvoj cílené proteomiky hraje zásadní roli možnost citlivé, specifické a mezilaboratorně dobře reprodukovatelné kvantifikace studovaného proteinu. V této oblasti dosud dominují převážně imunochemické přístupy (western blotting spojený s imunodetekcí, ELISA), které jsou závislé na dostupnosti kvalitních a specifických protilátek. Principiálně zcela odlišná technika hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry – MS) v poslední době nabízí alternativní přístupy cílené

kvantifikace proteinů na bázi vybraných proteotypických peptidů, jejichž představení je předmětem tohoto článku. Vychází přitom ze zkušeností s technicky ekvivalentním přístupem pro MS kvantifikaci nízkomolekulárních látek, který je řadu let využíván v oblasti farmaceutické a forenzní analýzy [3,4]. Jelikož metodický vývoj v této oblasti dosáhl úrovně potřebné k běžnému uplatnění v biologickém výzkumu včetně onkologického, byla cílená proteomika vyhodnocena časopisem *Nature Methods* jako metoda roku 2012 [5].

Základní metodou cílené proteomiky je tzv. monitorování vybraných reakcí (selected reaction monitoring – SRM), o níž jsme podrobně referovali již dříve [6], dále viz [7,8]. Pomocí metody SRM lze kvantifikovat až desítky předem vybraných proteinů v rámci jedné analýzy a díky širokému lineárnímu dynamickému rozsahu je tak možno stanovit proteiny obsažené v množství 45 až $1,3 \times 10^6$ kopií na buňku v jedné analýze [9]. Je však nezbytné mít pro dané proteiny optimalizované metody, což znamená především vybrané kombinace proteotypických peptidů a jejich specifických fragmentů, které poskytují dobrý signál. SRM se běžně provádí na relativně jednoduchých hmotnostních spektrometrech typu trojitý kvadrupól (QQQ) nebo hybridních systémů typu trojitý kvadrupól-lineární iontová past (QTRAP). Se zvyšující se citlivostí vysokorozlišovacích hmotnostních spektrometrů (Orbitrap, QExactive, qTOF) se v posledních letech rozšiřují možnosti cílené kvantifikace i na této složitější, ale univerzálnější instrumentaci. V tomto článku se proto budeme věnovat cílené kvantifikaci na hmotnostním spektrometru TripleTOF 5600+, který byl nedávno instalován na pracovišti RECAMO Masarykova onkologického ústavu a který umožňuje provádět také sběr digitálních fingerprintů pomocí metody HRM (hyper reaction monitoring) neboli SWATH (sequential windowed data independent acquisition of the total high resolution mass spectra). Z těchto fingerprintů lze následně, třeba několik let po provedené MS analýze, extrahovat kvantitativní data pro později zvolené proteiny našeho zájmu.

To staví proteomiku do zcela nového světla jako nástroje pro získání zcela nových proteomických dat z fyzicky již nedostupných vzorků, což žádná z dosud dostupných metod neumožňuje. Oba přístupy mají velký potenciál při verifikaci a validaci potenciálních biomarkerů nádorových onemocnění a při kvantifikaci vybraných proteinů v rámci studií zaměřených na studium biologické úlohy proteinů *in vitro* a *in vivo*.

Příprava vzorků pro cílenou proteomiku a chromatografická separace

Analýza vzorků pomocí cílené proteomiky probíhá podobně jako běžná proteomická LC-MS analýza s tím, že při přípravě vzorku je třeba zohlednit jeho charakter a typ použité kvantifikace. Proteiny se extrahují ze zmrazených či archivovaných tkání, případně z biologických tekutin. Vzorky analyzované v rámci onkologického výzkumu jsou obecně velmi komplexní. U vzorků typu sérum nebo plazma se proto někdy provádí imunochemické odstranění proteinů o velmi vysoké koncentraci. Pro proteiny o nízké koncentraci lze provést naopak obohacení pomocí protilátky vůči cílovému proteinu [8], která zvyšuje citlivost přístupu, přičemž specifita zůstává zajištěna MS identifikací; tento přístup se pak označuje jako „immuno-SRM“ [10]. Důležitou otázkou je přidavek izotopově značených peptidů zajišťujících přesnou kvantifikaci. Pro SRM se přidávají izotopově značené proteotypické peptidy o známé koncentraci, které sekvencí odpovídají peptidům z kvantifikovaných proteinů [11]. Pro HRM a SWATH jsou naopak obvykle přidávány směsi ověřených peptidů, jež slouží ke kalibraci retenčních časů u následné chromatografické separace a zvyšují tím spolehlivost celého přístupu. Získaný proteinový extrakt je redukován, alkylován a štěpen trypsinem, který specificky štěpí proteiny na C-straně lysinu a argininu, pokud nenásleduje prolin. Peptidové směsi jsou separovány na principu reverzní fázové chromatografie on-line propojené do hmotnostního spektrometru. Lze však použít i dvojrozměrnou (2D) chromatografickou separaci [12], která snižuje komplexitu

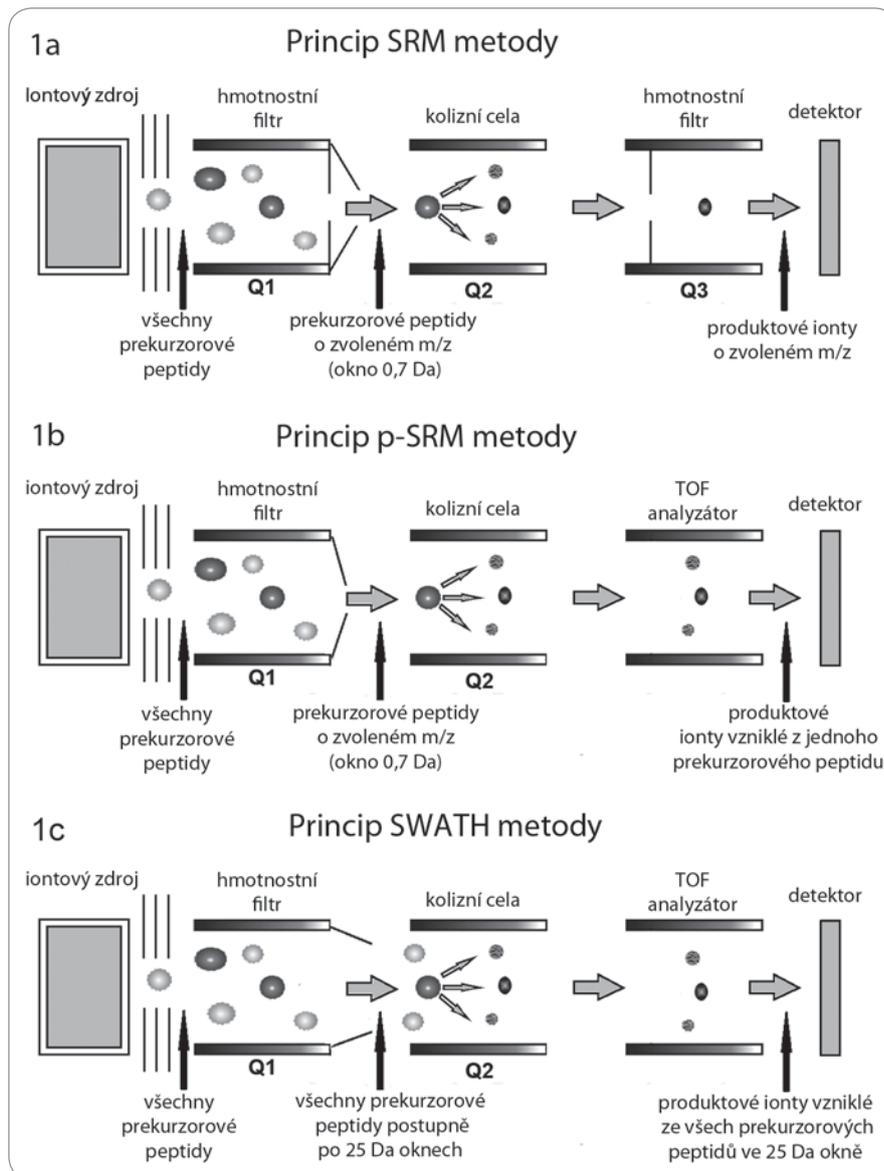
vzorku, interference a limity detekce, prodlužuje ale dobu experimentu. Chromatografií separované peptidy vstupují do (nano)elektrospreje, kde vlivem vysokého napětí dochází k jejich ionizaci, nabitě ionty poté vstupují do hmotnostního spektrometru.

Princip SRM a p-SRM

Základní princip SRM měřeného v hmotnostním spektrometru typu trojitý kvadrupól spočívá ve výběru peptidového iontu (prekurzorového iontu) v prvním hmotnostním analyzátoru (kvadrupól Q1). Peptid je následně fragmentován v kvadrupólu Q2, specifické peptidové fragmenty (produktové ionty) jsou pak vyfiltrovány díky nastavení kvadrupólu Q3 (obr. 1A, B), kterým tyto prochází na detektor [13]. Při SRM se tedy kvantifikují určité vybrané peptidy, typické pro daný protein. Z kvantitativních dat těchto peptidů se poté vypočítá kvantifikace celého proteinu. Modifikovaný přístup cílené kvantifikace u vysokorozlišovacího hmotnostního spektrometru typu TripleTOF se označuje jako pseudo-SRM (p-SRM). Modifikace spočívá v tom, že namísto měření jednotlivých předem vybraných fragmentů peptidů je měřeno celé peptidové spektrum pomocí analyzátoru „time-of-flight“ (TOF). Výhodou tohoto přístupu je jednodušší vývoj metod pro kvantifikaci konkrétních peptidů a lepší kontrola selektivity, nevýhodou je horší citlivost ve srovnání s přístroji typu QQQ nebo QTRAP obdobné generace.

Princip HRM/SWATH

Metoda HRM neboli SWATH je modifikací metody p-SRM. Zatímco při měření metodou p-SRM jsou pro získávání spekter vybírány pouze určité peptidy typické pro proteiny našeho zájmu, metoda SWATH je navržena k získání digitálního fingerprintu, z něhož lze později vyčíst kvantitativní data až pro několik tisíc peptidů. Pro sběr SWATH digitálních fingerprintů se škála m/z rozdělí na okna o šířce typicky 25 Da. Kvadrupól Q1 funguje jako hmotnostní filtr, který postupně propouští ionty o určitém rozsahu m/z do kolizní cely (obr. 1C). Nejedná se zde o jednotlivé ionty, jak je tomu v případě SRM a p-SRM (šířka okna 0,7 Da, obr. 1A, B), ale oblasti m/z o šířce

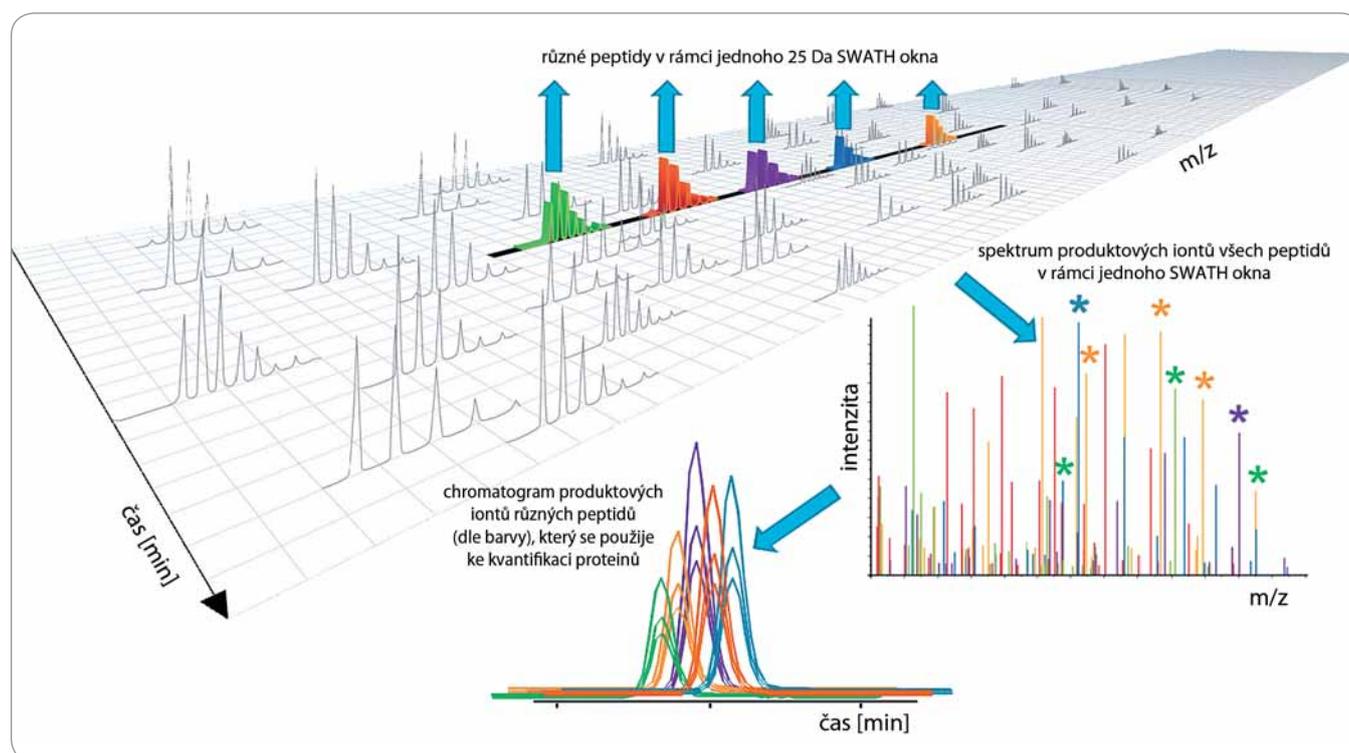


Obr. 1. Schéma hmotnostních spektrometrů pracujících v režimech SRM, p-SRM a SWATH/HRM.

Peptidy jsou separovány kapalinovou chromatografií, odkud vstupují do iontového zdroje, kde jsou účinkem vysokého napětí ionizovány. Nabitě peptidy pokračují do hmotnostního spektrometru. A. V SRM metodě filtruje kvadrupól Q1 pouze vybrané prekurzorové ionty (peptidy) o zvoleném poměru hmotnost/náboj (m/z), které pak pokračují do kolizní cely (Q2), kde jsou fragmentovány za vzniku produktových iontů (specifických peptidových fragmentů). Kvadrupól Q3, podobně jako Q1, zde funguje na principu hmotnostního filtru a propouští na detektor jen vybrané produktové ionty. B. Metoda p-SRM se od SRM v principu liší v posledním hmotnostním analyzátoru, kterým je analyzátor doby letu (time-of-flight – TOF). Zde dochází k analýze všech vzniklých produktových iontů na základě doby průletu k detektoru, nikoli jen vybraných. C. V případě metody SWATH/HRM kvadrupól Q1 postupně propouští do kolizní cely nikoliv jednotlivé prekurzorové ionty (peptidy), ale soubory peptidů spadajících do oblasti m/z (SWATH okna) o šířce typicky 25 Da. Všechny propuštěné ionty jsou pak fragmentovány v kolizní cely (Q2) a analyzovány pomocí analyzátoru doby letu (TOF).

25 Da. Takto je v průběhu LC-MS analýzy v krátkých cca 3 s trvajících cyklech opakovaně analyzována vždy celá ob-

last m/z spektra, což umožňuje získávat kvantitativní data pro všechny detekovatelné peptidy ve vzorku.



Obr. 2. Princip metody SWATH/HRM.

Metoda je založená na kvantifikaci produktových iontů vzniklých fragmentací všech prekurzorových iontů (peptidů) v tzv. SWATH oknech. SWATH okna jsou úseky škály m/z nejčastěji o šířce 25 Da (např. při zvoleném hmotnostním rozsahu $m/z = 400-100$ Da se postupně měří 28 SWATH oken v rámci jednoho cca 3 s trvajícího cyklu). Výsledkem měření každého SWATH okna je MS/MS spektrum na pravé straně obrázku. Chromatogram dole znázorňuje koeluci produktových iontů různých peptidů znázorněných různými barvami. Data z chromatogramu se poté využijí ke kvantifikaci peptidů a proteinů ve vzorku. Zdroj: ABCSCIEX, se svolením, upraveno dle [27].

Aplikace cílené proteomiky v onkologickém výzkumu

SRM je jednou z nejcitlivějších kvantitativních metod hmotnostní spektrometrie. V současnosti získává nenahraditelné postavení v oblasti validace proteinů, které by mohly hrát úlohu biomarkerů biologických stavů. Například Fortin et al [14] použili SRM v kombinaci s imunodeplecí vzorku pro stanovení klinicky rutinně užívaného markeru, prostatového specifického antigenu (PSA), v sérech pacientů s benigní hyperplazií prostaty a pacientů s nádory prostaty. Výsledky ukázaly dobrou korelaci výsledků uvedeného přístupu cílené proteomiky a běžně užívaného ELISA testu [14]. Hembrough et al [15] s pomocí SRM přístupu kvantifikovali epidermal growth factor receptor (EGFR) v buňkách linie odvozené z nádoru plic fixované v parafinu a ukázali dobrou shodu mezi daty získanými EGFR-SRM a ELISA daty ze vzorků nefixované kultury. Dále demonstrovali možnost SRM stanovení EGFR ve

vzorcích mikrodisekovaných z formalinem fixované tkáně xenograftů a tkáni nemalobuněčného karcinomu plic. Bylo prokázáno, že získaná data jsou velmi specifická pro EGFR a jednoznačně odlišují kvantifikaci EGFR od kvantifikace dalších příbuzných proteinů (např. IGF-1R, cMet, Her2, Her3 a Her4) [15]. Metoda SRM má dále potenciál ve validaci nových potenciálních biomarkerů. Hladiny tří z pěti SRM validovaných proteinů (14-3-3 σ , gelsolin, lumican, transglutaminasa 2 a tissue inhibitor of metalloproteinase 1) vykazaly schopnost odlišení nádorů pankreatu od kontrol v daném souboru pacientů, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo pro gelsolin [16]. Podobně byla testována včasná detekce hepatocelulárního karcinomu u pacientů po infekci hepatitidou C. V souboru 50 pacientů byly skupiny pacientů s nádorem a bez nádoru jednoznačně rozlišeny pomocí hladin apolipoproteinu A1 stanovených pomocí SRM, přičemž data byla potvrzena dalšími ne-

závislými metodami [17]. Pro vývoj stanovení nových proteinů pomocí SRM jsou dále vyvíjeny nové rychlejší a efektivnější přístupy. Jeden z nich [18] umožnil vývoj metod pro kvantifikaci jak klinicky rutinně užívaného markeru nádorů vaječníku, CA125, tak i dalších zvažovaných biomarkerů (beta-2-mikroglubulin, apolipoprotein A1, transthyretin a transferrin). Vyvinuté metody jsou k dispozici ve formě veřejně přístupné SRM knihovny [18].

V signalizaci u nádorových procesů mají velký význam posttranslační modifikace proteinů, jako je fosforylace, ale také acetylace či glykosylace. Wolf-Yadlin et al [19] demonstrovali velmi efektivní SRM přístup pro analýzu fosforylací na 222 fosforylačních místech proteinů po stimulaci buněk EGF. Bylo přítom identifikováno a sledováno 31 fosforylačních míst, která dosud s EGF stimulací nebyla spojována. Publikovaný přístup umožňuje rutinní analýzu stovek fosforylačních míst za různých volitelných

biologických podmínek [19]. Griffiths et al [20] dále zjistili, že metoda SRM je 10násobně citlivější v porovnání s ostatními metodami pro sledování acetylace, a tímto způsobem byli schopni identifikovat pět nových acetylačních míst u cytokkeratinu 8 [20]. Hülsmeier et al [21] studovali pomocí SRM vrozenou poruchu glykosylace. Cíleně se zaměřili na glykosylace u α -1-antitrypsinu a transferrinu a pomocí SRM zjistili vztah mezi sníženou glykosylací a závažností CDG syndromu [21]. Glykosylace mají rovněž význam z toho důvodu, že řada sekretovaných proteinů použitelných jako nein vazivní biomarkery je glykosylovaných.

Aplikace metody HRM/SWATH v onkologickém výzkumu

Metoda SWATH umožňuje i zpětnou kvantifikaci všech detekovatelných proteinů ve vzorku [22] z naměřených digitálních fingerprintů. Jelikož se jedná o metodu velmi novou, počet publikovaných prací je zatím omezený a ty se zaměřují převážně na strukturní a funkční studie proteinů na molekulární úrovni. Doposud byla metoda SWATH úspěšně využita ke studiu Her-2/neu receptoru (ErbB2) a jeho fosforylované a acetylované formy [23]. Potenciál metody SWATH byl též demonstrován na vzorcích lidské plazmy získaných od zdravých jedinců, v nichž bylo cíleně sledováno 41 N-glykopeptidů pomocí metod SWATH a SRM. V obou posledně jmenovaných studiích bylo zjištěno, že SWATH má sice nižší citlivost v porovnání se SRM, vývoj kvantifikačních metod však trvá kratší dobu a metoda umožňuje kvantifikovat podstatně více proteinů v jednom běhu. Reprodukovatelnost SRM a SWATH byla podobná [24]. SWATH může najít uplatnění také ve funkčním studiu pronádorových procesů, konkrétně při charakterizaci protein-proteinových interakcí. V této oblasti byl studován vliv stimula ce PI-3K/AKT signální dráhy na interak tom proteinu 14-3-3 β . Vzorky byly připraveny pomocí „pull-down“ afinitní purifikace, která byla prováděna v různých časech po přidání IGF1 (insulin-like growth factor 1 – stimula tor PI-3K/AKT dráhy). Výsledky dynamicky popisují interak tom proteinu 14-3-3 β při aktivaci zmíněné dráhy, přičemž bylo identifikováno

několik skupin interagujících proteinů, jež vykazovaly zcela odlišné chování v odpovědi na stimulaci [25]. V jiné studii se autoři zaměřili na charakterizaci změn protein-proteinových interakcí souvisejících s mutacemi cyk lin dependentní kinázy 4 (CDK4), které se vyskytují u melanomů. Metoda AP-SWATH odhalila 17 proteinů, jež ve zvýšené míře interagovaly s mutantními formami CDK4 v porovnání s wild type formou proteinu. Interakce mutantních forem CDK4 s Hsp90 proteiny (Hsp90 α , Hsp90 β) byly zvýšeny trojnásobně v porovnání s wild type. Mutantní formy CDK4 naopak téměř neinteragovaly s INK proteiny (p15INK, p16INK, p18INK a p19INK – polypeptidové inhibitory CDK4) v porovnání s wild type [26]. Z uvedených výsledků lze říci, že metoda SWATH je robustním přístupem pro charakterizaci změn v posttranslačních modifikacích proteinů a jejich protein-proteinových interakcích, který nevyžaduje použití značení. V současné době prováděné studie se rovněž zaměřují na koncept digitalizovaných biobank, který by z jedenkrát naměřených dat metodou SWATH umožnil v budoucnu kdykoliv extrahovat jakékoliv dostupné kvantita tivní proteinové informace.

Závěr

Experimentálně náročné proteomické techniky vykazují v posledních letech metodický rozvoj, který stále více umožňuje splnit představy lékařů, biologů a dalších výzkumných pracovníků. To odráží zejména stále se zvyšující podíl proteomu, jenž může být rutinně sledován. Nové metody cílené kvantifikace přispívají výrazným zlepšením k reprodukovatelnosti, kvantifikovatelnosti a ke zvýšení počtu vzorků, které mohou být zařazeny do proteomických studií. Zde prezentované práce ilustrují úspěšné aplikace cílené proteomiky v oblasti onkologického výzkumu, jež v mnoha případech směřují k reálnému uplatnění v klinické praxi. Laboratoř hmotnostní spektrometrie Masarykova onkologického ústavu s hmotnostními spektrometry TripleTOF 5600+ a Orbitrap ELITE je připravena, ve spolupráci se specialisty napříč obory, k tomuto úsilí významně přispět.

Literatura

1. Faktor J, Dvořáková M, Maryáš J et al. Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies. *Klin onkol* 2012; 25 (Suppl 2): 2570–2577.
2. Maryáš J, Faktor J, Dvořáková M et al. Proteomics in investigation of cancer metastasis: functional and clinical consequences and methodological challenges. *Proteomics* 2014; 14(4–5): 426–440. doi: 10.1002/pmic.201300264.
3. Humplíková S, Minář J, Kučerová M et al. Stanovení hladiny celkového homocysteinu v plazmě kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií. *Klin Biochem Metab* 2007; 15(36): 31–34.
4. Kim K, Kim Y. Preparing multiple reaction monitoring for quantitative clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2009; 6(3): 225–229. doi: 10.1586/epr.09.11.
5. Marx V. Targeted proteomics. *Nat Methods* 2013; 10(1): 19–22.
6. Faktor J, Struhárová I, Fučíková A et al. Kvantifikace proteinových biomarkerů pomocí hmotnostní spektrometrie pracující v režimu monitorování vybraných reakcí. *Chemické listy* 2011; 105(11): 846–850.
7. Kitteringham NR, Jenkins RE, Lane CS et al. Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(13): 1229–1239. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.11.013.
8. Gallien S, Duriez E, Domon B. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J Mass Spectrom* 2011; 46(3): 298–312. doi: 10.1002/jms.1895.
9. Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN et al. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell* 2009; 138(4): 795–806. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.051.
10. Anderson NL, Anderson NG, Haines LR et al. Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies (SISCAPA). *J Proteome Res* 2004; 3(2): 235–244.
11. Lange V, Picotti P, Domon B et al. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2008; 4: 222. doi: 10.1038/msb.2008.61.
12. Whiteaker JR, Lin C, Kennedy J et al. A targeted proteomics-based pipeline for verification of biomarkers in plasma. *Nat Biotechnol* 2011; 29(7): 625–634. doi: 10.1038/nbt.1900.
13. Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol* 2009; 3(1): 33–44. doi: 10.1016/j.molonc.2008.12.001.
14. Fortin T, Salvador A, ChARRIER JP et al. Clinical quantitation of prostate-specific antigen biomarker in the low nanogram/milliliter range by conventional bore liquid chromatography-tandem mass spectrometry (multiple reaction monitoring) coupling and correlation with ELISA tests. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8(5): 1006–1015. doi: 10.1074/mcp.M800238-MCP200.
15. Hembrough T, Thyparambil S, Liao WL et al. Selected reaction monitoring (SRM) analysis of epidermal growth factor receptor (EGFR) in formalin fixed tumor tissue. *Clin Proteomics* 2012; 9(1): 5. doi: 10.1186/1559-0275-9-5.
16. Pan S, Chen R, Brand RE et al. Multiplex targeted proteomic assay for biomarker detection in plasma: a pancreatic cancer biomarker case study. *J Proteome Res* 2012; 11(3): 1937–1948. doi: 10.1021/pr201117w.
17. Mustafa MG, Petersen JR, Ju H et al. Biomarker discovery for early detection of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-infected patients. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12(12): 3640–3652. doi: 10.1074/mcp.M113.031252.
18. Hüttenhain R, Soste M, Selevsek N et al. Reproducible quantification of cancer-associated proteins in body fluids using targeted proteomics. *Sci Transl Med* 2012; 4(142): 142ra94. doi: 10.1126/scitranslmed.3003989.

19. Wolf-Yadlin A, Hautaniemi S, Lauffenburger DA et al. Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(14): 5860–5865.
20. Griffiths JR, Unwin RD, Evans CA et al. The application of a hypothesis-driven strategy to the sensitive detection and location of acetylated lysine residues. *J Am Soc Mass Spectrom* 2007; 18(8): 1423–1428.
21. Hülsmeyer AJ, Paesold-Burda P, Hennet T. N-glycosylation site occupancy in serum glycoproteins using multiple reaction monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(12): 2132–2138.
22. Gillet LC, Navarro P, Tate S et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(6): O111.016717. doi: 10.1074/mcp.O111.016717.
23. Held JM, Schilling B, D'Souza AK et al. Label-free quantitation and mapping of the ErbB2 tumor receptor by multiple protease digestion with data-dependent (MS1) and data-independent (MS2) acquisitions. *Int J Proteomics* 2013; 2013: 791985. doi: 10.1155/2013/791985.
24. Liu Y, Hüttenhain R, Surinova S et al. Quantitative measurements of N-linked glycoproteins in human plasma by SWATH-MS. *Proteomics* 2013; 13(8): 1247–1256. doi: 10.1002/pmic.201200417.
25. Collins BC, Gillet LC, Rosenberger G et al. Quantifying protein interaction dynamics by SWATH mass spectrometry: application to the 14-3-3 system. *Nat Methods* 2013; 10(12): 1246–1253. doi: 10.1038/nmeth.2703.
26. Lambert JP, Ivosev G, Couzens AL et al. Mapping differential interactomes by affinity purification coupled with data-independent mass spectrometry acquisition. *Nat Methods* 2013; 10(12): 1239–1245. doi: 10.1038/nmeth.2702.
27. Baumann C (ed.). MS/MSALL with SWATH™ acquisition global quantitative strategies for proteomics & beyond. AB SCIEX Germany; c2012 [cited 2014 February]. Available from: http://proteomics-seminar.imp.ac.at/fileadmin/imp/Images/Proteomics_seminar/2012/Christian_Baumann_MSMSall_with_SWATH_Acquisition.pdf.

Analýza fosfoproteínov a signálnych dráh kvantitatívno-proteomickými metódami

An analysis of Phosphoproteins and Signalling Pathways by Quantitative Proteomics

Pjechová M.¹, Hernychová L.¹, Tomašec P.^{1,2}, Wilkinson G. W.^{1,2}, Vojtěšek B.¹

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Department of Medical Microbiology, Institute of Infection and Immunity, School of Medicine, Cardiff University, United Kingdom

Súhrn

Fosforylácia proteínov má kľúčovú úlohu v regulácii bunkových signálnych dráh. Je zahrnutá vo väčšine bunkových dejov, v ktorých súhra medzi kinázami a fosfatázami prísne kontroluje bunkové deje ako napr. proliferáciu, diferenciáciu a apoptózu. Chybné alebo pozmenené signálne dráhy sa mnohokrát podieľajú na vzniku rôznych chorôb, čo iba zdôrazňuje dôležitosť štúdia fosfoproteómu. Abundancia fosfoproteínov je v proteóme často veľmi nízka a na ich analýzu sú potrebné vysoko citlivé a špecifické prístupy. Metódami kvantitatívnej proteomiky je možné analyzovať zmeny v abundancii jednotlivých proteínov a ich posttranslačných modifikáciách a následne i v signálnych dráhach buniek. V tomto článku sa venujeme kvantitatívno-proteomickým metódam, ktoré je možné použiť pri štúdiu fosfoproteínov a ich zapojení do signálnych dráh.

Kľúčové slová

proteomika – fosfoproteíny – signálne dráhy

Summary

Protein phosphorylation is a key regulator in cellular signaling pathways. It is involved in most cellular events in which interplay between phosphatases and kinases strictly controls biological processes, such as differentiation, proliferation and apoptosis. Altered or defective signaling pathways often result in various diseases, emphasizing the importance of studying the phosphoproteome. The abundance of phosphoproteins in the proteome is often very low, which requires specific and highly sensitive approaches. By using quantitative proteomics methods, we are able to analyze changes in abundance of proteins and their posttranslational modifications and then changes in signaling pathways. In this review, we describe quantitative proteomics methods, which could be used for study of phosphoproteins and their connection in signaling pathways.

Key words

proteomics – phosphoproteins – signaling pathways

Práca bola podporená Európskym fondom pre regionálny rozvoj a štátnym rozpočtom Českej republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklaruji, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Mariana Pjechová
Regionální centrum aplikované molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: mariana.pjechova@mou.cz

Obdržené/Submitted: 30. 1. 2014

Přijaté/Accepted: 14. 4. 2014

Úvod

Fosforylácia proteínov je jedným z najrozšírenejších regulačných mechanizmov v prírode. Je kľúčovým regulátorom vnútrobunkových biologických procesov a momentálne najštudovanejšou posttranslačnou modifikáciou proteínov. Fosforyláciou je obvykle iniciovaná signálna transdukcija a šírené signály v signálnych dráhach buniek. Je to dočasná a reverzibilná posttranslačná modifikácia, ktorá vedie k zmenám konformácie, aktivity a interakcií proteínov vo veľmi krátkom časovom úseku. Proteínovú fosforyláciu riadia dve skupiny proteínov: kinázy (fosforylujú proteíny) a fosfatázy (defosforylujú proteíny). Často sú fosforylované viaceré rezidua proteínu, a to väčšinou rôznymi kinázami. Spomedzi aminokyselín sa u eukaryotov môže fosforylovať serín, treonín, tyrozín a histidín, ktorý je však veľmi labilný a zriedka identifikovaný vo fosfoproteomických štúdiách.

Prístupy kvantitatívnej proteomiky nám dovoľujú analyzovať zmeny v expresii proteínov (a fosfoproteínov) za rôznych podmienok a taktiež aj určit zmenu fosforylácie jednotlivých proteínov, ktoré tvoria základnú funkčnú jednotku signálnych dráh.

V porovnaní s ostatnými proteínmi sú fosfoproteíny v bunkách prítomné vo veľmi nízkych množstvách, čo komplikuje ich detekciu hmotnostným spektrometrom a následné analýzy. Z tohto dôvodu sú potrebné techniky, ktoré umožňujú obohatenie vzoriek o fosfopeptidy (po proteolytickom štiepení proteínov na peptidy) pred hmotnostne spektrometrickou analýzou. „Strong cation exchange chromatography“ (SCX) [1], „hydrophilic interaction liquid chromatography“ (HILIC) [2], obohatenie fosfopeptidov oxidom titaničitým (TiO₂) [3] či „immobilized metal ion affinity chromatography“ (IMAC) [1] patria medzi techniky pomocou ktorých sme schopní úspešne izolovať fosfopeptidy pred MS analýzou. Následná kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou MS analýzou (LC-MS/MS) je vhodný prístup, ktorý dovoľuje identifikáciu a kvantifikáciu tisícok fosforylačných miest počas jednej analýzy. Tieto, ale aj ďalšie metódy a postupy použí-

vané vo fosfoproteomických experimentoch budeme bližšie rozoberať v nasledujúcej časti článku.

Metódy kvantifikácie fosfoproteínov

Na kvantifikáciu zmien fosfoproteínov je možné použiť proteomické prístupy ako napr. „stable isotope labeling with amino acids in cell culture“ (SILAC) [4], ktorý sa dá použiť iba na živé bunkové kultúry. Jedná sa o metabolické značenie aminokyselín, pri ktorom v priebehu kultivácie dochádza k inkorporácii ťažkých aminokyselín (značené stabilné izotopy lyzínu a arginínu) do novosyntetizovaných proteínov. Pri tejto metóde je možné použiť ťažké izotopy lyzínu a arginínu (R10K8), stredne ťažké izotopy lyzínu a arginínu (R6K4) a neznačené, ľahké médium (R0K0).

Medzi izotopické značenia fosfopeptidov patria napr. ICAT, dimetylové a ¹⁸O značenie.

ICAT (isotope-coded affinity tags), teda thiol-reaktívne molekuly obsahujúce ťažké alebo ľahké izotopy, predstavuje jednu z najstarších techník [5]. ICAT značka pozostáva z reaktívnej skupiny, ktorá je orientovaná na cysteín, polymerového linkera s ôsmimi deuteriami a biotínovej skupiny, ktorá dovoľuje purifikáciu značených peptidov. V ICAT experimente sú dva proteínové pooly denaturované a redukované, cysteínové rezidua proteínov sú následne značené ľahkým alebo ťažkým reagentom. Značené pooly sú potom zmiešané, prečistené od nadbytečného reagentu a štiepené vhodnou proteázou. Peptidy obsahujúce cysteín, nesúce ľahkú alebo ťažkú značku sú následne zachytené pomocou avidínovej kolóny, cez biotínovú skupinu na značke. Peptidy sú potom vyeluované z kolóny a analyzované na MS [6].

Pri dimetylovom značení sú proteíny najprv štiepené vhodnou proteázou, ako napr. trypsin, následne sú peptidy z rôznych vzoriek označené dimetylovými značkami a analyzované na LC/MS, pričom rozdiel abundancie dimetylových značiek je použitý na porovnanie rozdielov v abundancii peptidov vo vzorkách. Toto značenie je založené na reakcii primárnych peptidových amínov (N-konce

peptidov a epsilonové amino skupiny lyzínových rezidui) s formaldehydom a vytvorení Schiff bázy, ktorá je rapidne redukovaná pridaním cyanoborohydridu. Dimetylové značenie je možné použiť ako triplex, kde je pri značení „ľahkou značkou“ použitý obyčajný formaldehyd a cyanoborohydrid, čo spôsobí zvýšenie hmotnosti o 28 Da na primárny amín v peptide. Použitie denaturovaného formaldehydu a obyčajného cyanoborohydridu spôsobí zvýšenie hmotnosti o 32 Da, čo je stredná značka [7]. Inkorporácia ťažkej značky je dosiahnutá kombináciou denaturovaného a ¹³C-značeného formaldehydu s cyanoborodeuteridom, čo vedie k zvýšeniu hmotnosti o 36 Da [8].

Značenie pomocou ¹⁸O je relatívne jednoduchá, enzýmovo-sprostredkovaná technika značenia peptidov pomocou H₂ ¹⁸O. Tento prístup je spojený s proteázami 2. triedy, napr. trypsinom, ktoré katalyzujú výmenu dvoch ¹⁶O atómov za dva ¹⁸O atómy na C-terminálnej karboxylovej skupine proteolitického peptidu, čo vedie k posunu hmotnosti o 4 Da medzi 1-krát nabitými rôzne značenými peptidmi v MS1 móde [6].

TMT (tandem mass tag) [9] a iTRAQ (the isobaric tag for relative and absolute quantitation) [10] sú izobarické značenia fungujúce na veľmi podobnom princípe. V porovnaní s tradičnými kvantifikačnými metódami sú schopné použitím tandemovej MS analýzy simultánne identifikovať a kvantifikovať 6–8 vzoriek. TMT molekula pozostáva z reaktívnej skupiny, ktorá značí primárne amínové skupiny; reportérovej skupiny, ktorá udáva v MS/MS móde abundanciu peptidu po zmiešaní peptidov; odštiepiteľného linkeru, ktorý uvoľňuje TMT reporterový fragment v MS/MS analýze a hmotnostne normalizačnej skupiny, ktorá vyrovnáva hmotnostné rozdiely medzi jednotlivými reportérovými fragmentami na udržanie konštantnej celkovej hmotnosti značiek v sete [11]. Keďže sa jedná o izobarické značky, kvantifikácia prevedená v MS/MS móde porovnaním plôch píkovo označených iónov vychádza z fragmentácie značky, teda rovnaké spektrum je použité na kvantifikáciu a identifikáciu fosfopeptidu [12].

Pri label free kvantifikácii sú proteínové zmesi analyzované priamo a vzorky sú navzájom porovnané až po samostatných analýzach. Pri tejto metóde nie sú vzorky zmiešané, teda je možné dosiahnuť vyššieho proteómového pokrytia a neexistuje žiaden limit v počte vzoriek, ktoré môžu byť porovnávané [13]. Nevýhodou tohto prístupu je neprítomnosť formálneho vnútorného štandardu, čo môže viesť k významným chybám v individuálnych datasetoch. Tento nedostatok je však minimalizovaný analýzou niekoľkých biologických replikátov [6].

Proteolytické štiepenie

Pred hmotnostnou analýzou je potrebné vzorky upraviť tak, aby boli kompatibilné s meraním na hmotnostnom spektrometri. Prvým krokom je štiepenie proteínov na peptidy použitím vhodnej proteázy. Na to, aby mohla proteáza proteíny efektívne štiepiť, je potrebná ich denaturácia, redukcia a alkylácia. Na denaturáciu sa používajú rôzne reagenty, napr. β -merkaptotanol, SDS. Medzi najviac používané redukčné činidlo patrí dithio-treitol (DTT) alebo Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP), ktoré redukujú disulfidové mostíky medzi cysteínovými skupinami. Nasleduje alkylácia thiolových skupín pomocou jódacetamidu (IAA), ktorý zabráňuje ich reoxidácii. Proteíny sú potom štiepené proteázami na peptidy, ktoré je možné analyzovať na hmotnostnom spektrometri. Používajú sa proteázy s vysokou špecificitou štiepenia, aminokyselinové reťazce štiepia iba za určitými aminokyselinami. Jednou z najbežnejšie používaných proteáz je trypsin, ktorý štiepi reťazec aminokyselín na karboxylovej strane lyzínu a arginínu, ak za nimi nenasleduje prolín. Existuje viacero postupov, ako proteíny pripraviť na proteolytické štiepenie. Ich výber závisí na type a množstve vzorky, keďže pri niektorých postupoch sú starty vzoriek väčšie než pri iných.

Pred vlastným proteolytickým štiepením je potrebné odstrániť denaturačný roztok, ktorý nie je kompatibilný s proteolytickými enzýmami, a preto sa zamieňa za roztok močoviny. Pri „filter aided sample preparation“ (FASP) protokole sa tento krok deje na „cut off“ fil-

tri (10 kDa, alebo 30 kDa), kde prebieha aj následná redukcia, alkylácia a vlastné proteolytické štiepenie. Medzi nevýhody tohto postupu patrí čiastočná strata vstupného materiálu na filtri [14].

Štiepenie v roztoku je postup, pri ktorom sa do skúmavky so vzorkou proteínov postupne pridávajú jednotlivé roztoky zaisťujúce denaturáciu, redukciu a alkyláciu (napr. močovina, DTT, IAA). Prebytok alkylačného činidla je následne odstránený pridaním redukčného činidla, aby sa v hmotnostnom spektre neobjavovali satelitné peptidové píky nesúce vzniknuté modifikácie zvyšujúce ich m/z . Nakoniec sa pridáva proteáza a roztok NH_4HCO_3 , ktorý je s ňou kompatibilný a poskytuje vhodné podmienky na štiepenie. V prípade tohto postupu vstupný materiál síce zostáva zachovaný, ale všetky pridané reagenty zostávajú v roztoku spolu so vzorkou a pred ďalším krokom je nutné získané peptidy purifikovať [15].

Pri štiepení proteínov v géli sa bunkový lyzát najprv rozseparuje na polyakrylamidovom géli. Zväčša sa používajú denaturačné 1D alebo 2D elektroforézy, ktoré separujú denaturované proteíny podľa molekulovej hmotnosti (proteíny s najvyššou hmotnosťou putujú v géli najpomalšie), čím zároveň umožňujú presné stanovenie molekulovej hmotnosti. Pri 1D elektroforéze sa proteíny separujú iba podľa molekulovej hmotnosti. Pri 2D elektroforéze sa proteíny rozdeľujú najprv podľa izoelektrického bodu, čo je pH, pri ktorom majú molekuly nulový náboj, a nepohybujú sa v elektrickom poli [16]. Nasleduje ich delenie v druhom smere podľa molekulovej hmotnosti. Najväčšou výhodou týchto postupov je prečistenie proteínov od nízkomolekulových nečistôt, ako napr. detergentov a zložiek pufrův, ktoré často nie sú kompatibilné s následnou MS analýzou. Na vizualizáciu proteínov sa používajú napr. trifenylmetánové farbivá Coomassie brilliant blue (R250, G250), ktoré sa viažu na proteíny prostredníctvom van der Waalesových a elektrostatických interakcií [17]. Najbežnejšie používanou je Coomassie brilliant blue G250, ktorá je schopná vizualizovať už 0,3 ng proteínu v géli. Komerčne sú dostupné aj fluorescenčné

značky, napr. Sypro Ruby, Flamingo, či Deep Purple, ktoré majú senzitivitu okolo 1 ng detekovaného proteínu. Veľmi citlivým prístupom je farbenie striebrom, pomocou ktorého je možné vizualizovať 0,3 ng proteínu. Po farbení sú jednotlivé bandy vyrezané z gélu, odfarbené a proteíny štiepené proteázou. Nevýhoda tejto metódy spočíva v strate proteínov nerozpustných v SDS pufrí a proteínov s nízkou molekulovou hmotnosťou [18].

Separácia peptidov pomocou kvapalinovej chromatografie

Na rozdelenie komplexných vzoriek peptidov získaných FASP protokolom alebo štiepením v roztoku, ako aj na odstránenie zložiek, ktoré môžu interferovať s ďalšími postupmi, je možné použiť kvapalinovú chromatografiu. High-performance liquid chromatography (HPLC) môže byť použitá na separáciu peptidov na základe hydrofobicity, náboja alebo veľkosti. Kombináciou vhodných analytických kolón a gradientov je možné vybrať frakcie obsahujúce peptidy a fosfopeptidy a ďalej ich analyzovať. Vybrané typy kolón a ich vlastnosti budú popísané v ďalšej časti:

- Na negatívne nabitých funkčných skupinách kolóny strong cation exchange chromatography (SCX) sa pri pH 2,7 zachytávajú najmä 1-krát fosforylované +1 kladne nabité fosfopeptidy. V eluovanej frakcii sa nachádzajú multifosforylované peptidy, preto je nutné eluát zachytiť [1].
- Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) je vysoko rozlišovacia separačná technika, pri ktorej sa využívajú vodíkové interakcie medzi peptidom a neutrálnou, hydrofilnou stacionárnou fázou. Retencia vzrastá so zvyšujúcou sa polaritou peptidu. Vzorky sú nanášané vo fáze s vysokým podielom organických zlúčenín a eluované zvyšujúcou sa polaritou mobilnej fázy [2].
- Electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography (ERLIC) je separácia založená na anion exchange chromatography v kombinácii s hydrofilnými interakciami. Fosfátové skupiny sú čiastočne ionizované a elektrostaticky priťahované k stacionárnej

fáze. Ako prvé sú eluované nefosforylované, monofosforylované a difosforylované peptidy, keďže multifosforylované peptidy obsahujú viacero negatívnych nábojov na fosfátových skupinách a eluujú sa neskôr [19].

Techniky obohacovania vzoriek o fosfopeptidy

Obohatenie fosfopeptidov je kľúčový krok v príprave vzoriek na identifikovanie fosforylovaných aminokyselín. Koncentrácia fosfoproteínov je v bunke v porovnaní s ostatnými proteínmi veľmi nízka a sú takmer nemerateľné dostupnými technikami hmotnostnej spektrometrie. Fosfopeptidy zle ionizujú, čo je dôsledkom prítomnosti fosfátovej skupiny, ktorá je záporne nabitá. Tým ovplyvňuje efektivitu ionizácie a detekcie pri kyslých podmienkach, ktoré sa používajú pri analýze v pozitívnom móde [20]. Fosfopeptidy bývajú v spektrách prekryté fragmentmi nefosforylovaných/abundantnejších peptidových iónov, ktoré majú oveľa vyššiu intenzitu signálu. Na získanie/obohatenie fosfopeptidov zo vzoriek bolo vyvinutých viacero metód, ktoré využívajú väzbu fosfátovej skupiny na maticu. Medzi najviac používané obohacovacie metódy patria obohatenie fosfopeptidov oxidom titaničitým (TiO_2), immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) a sequential elution from IMAC (SIMAC).

V prípade TiO_2 (voľné častice s priemerom 10 μm) dochádza k väzbe fosfopeptidu cez fosfátové OH skupiny za kyslých podmienok. Uvoľnenie tejto väzby nastáva za zásaditých podmienok, pričom uvoľnené sú najmä monofosforylované peptidy (multifosforylované peptidy sa na TiO_2 viažu s príliš vysokou afinitou a ich elúcia je veľmi obtiažna). Na TiO_2 sa môžu viazať aj kyslé peptidy, čomu sa dá predísť znížením pH kyseliny trifluóroctovou alebo pridaním kyseliny dihydrobenzoovej, či mliečnej, ktoré sa na TiO_2 viažu s vyššou afinitou než kyslé peptidy, ale s nižšou než fosfopeptidy [3].

Pri metóde IMAC sú ióny kovov (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Co^{2+}) chelátované na častice pokryté nitrilotrioctovou alebo iminodictovou kyselinou, čím vytvárajú sta-

cionárnu fázu, na ktorú sa môžu naviazať negatívne nabité fosfopeptidy v mobilnej fáze. Táto metóda je vhodná hlavne pre obohatenie multifosforylovaných peptidov. Vážnym problémom tohto postupu je nešpecifická väzba nefosforylovaných peptidov obsahujúcich viacnásobne kyslé reziduá aminokyselín, čo znižuje selektivitu. Jednou z možností ako zvýšiť selektivitu tejto metódy je rovnako ako pri TiO_2 zníženie pH [1].

SIMAC metóda kombinuje výhody TiO_2 a IMAC prístupu. Keďže pri IMAC sú preferenčne naviazané multifosforylované peptidy a pri TiO_2 monofosforylované, kombináciou týchto dvoch metód je možné dosiahnuť jednoduchého obohatenia mono- i multifosforylovaných peptidov. IMAC je použitý ako prvý krok, kde po väzbe nasleduje elúcia monofosforylovaných peptidov za kyslých podmienok (pH 1,0) a potom elúcia multifosforylovaných peptidov za základných podmienok (pH 11,3). Ďalším krokom je obohatenie monofosforylovaných peptidov TiO_2 časticami [1].

Hmotnostne spektrometrická analýza

Peptidy (fosfopeptidy) je možné identifikovať pomocou MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization – mass spectrometry, tj. hmotnostného spektrometru s ionizáciou pomocou laseru za účasti matrice) alebo prostredníctvom LC-MS/MS (liquid chromatography – mass spectrometry) s elektrosprejovou ionizáciou. Pri hlbších fosforylačných štúdiách je dôležité určiť špecifickú aminokyselinu, ktorá bola fosforylovaná (miesto fosforylácie) v danom biologickom experimente. Preto sa využíva tandemová MS analýza s collision-induced dissociation (CID) a electron-transfer dissociation (ETD) fragmentáciou. Pri CID fragmentácii dochádza k strate fosfátovej skupiny H_3PO_4 pri fosfoseríne a fosfotreoníne a HPO_3 pri fosfotyrozíne. Nedostatkami tejto metódy sú nízka ionizačná efektivita a skorá strata labilnej fosfátovej skupiny, čo má za následok nízky počet peptidových fragmentov na identifikáciu. ETD štípe peptidovú kosť bez odštiepenia labilných posttranslačných mo-

difikácií, ako napr. fosforylácie. ETD má vyššiu pravdepodobnosť úspešnej fosfopeptidovej identifikácie pre prekuzory s nízkym m/z a nábojovým stavom > 2 , kým CID je úspešnejšia pre dvojnásobne nabité peptidy a tie s vysokým m/z [21]. Niektoré štúdie porovnávajú ETD a CID navrhujú využitie oboch metód fragmentácie na dosiahnutie komplexnej analýzy fosforylácie [21–23].

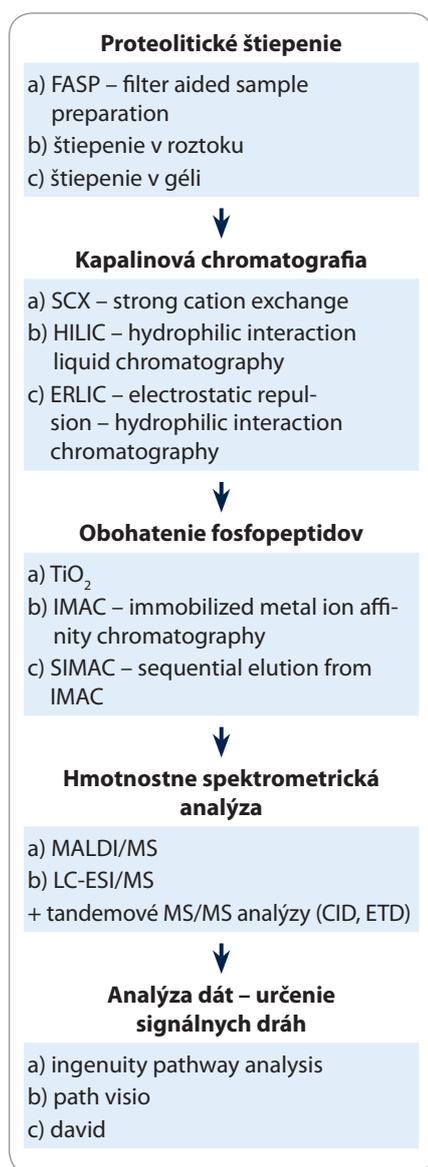
Analyzovanie dát

Kritickou súčasťou všetkých proteomických štúdií je analýza dát, pri ktorej sa využívajú bioinformatické a štatistické prístupy. Získané MS/MS dáta sú porovnané s databázou Uniprot proteome [24] s použitím softwarov Mascot (Matrix Science Inc.) alebo Sequest [25]. Na spracovanie dát, prehľadanie databáz a kvantitatívne vyhodnotenie rozdielov medzi fosfoproteínmi v jednotlivých vzorkách je možné použiť program Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific) s algoritmom PhosphoRS 3.1 [26] umožňujúcim predikciu lokalizácie fosforylovaných miest. K dispozícii sú aj ďalšie podobné programy MaxQuant [27] a SkyLine [28].

Pri identifikovaných fosfoproteínoch je potrebné brať do úvahy zmenu fosforylácie oproti kontrolnej vzorke a celkovej expresii proteínu. Proteíny so signifikantnými zmenami fosforylácie môžu byť ďalej použité na štúdium signálnych dráh pomocou špecializovaných programov ako napr. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) [29], David [30] alebo PathVisio [31]. Tieto programy sú schopné graficky znázorniť signálne dráhy na základe informácií získaných z databáz a vedeckých publikácií. Umožňujú tiež porovnanie jednotlivých dráh, a teda definovanie hlavných rozdielov medzi signálnymi dráhami v rôznych bunkách.

Záver

Na štúdium zmien v signálnych dráhach buniek je možné využiť proteomické prístupy. Kvantitatívna proteomika umožňuje určiť zmeny v signálnych dráhach zahŕňajúce zmeny v expresii proteínov, ako aj zmeny v posttranslačných modifikáciách (fosforyláciách), ktoré



Tab. 1. Schéma postupu spracovania vzorky proteomickými metódami.

sú základným mechanizmom pri zapínaní/vypínaní signálnych dráh. Vzhľadom na nízku abundanciu fosfoproteínov v bunkách a ich problematické zachytenie hmotnostným spektrometrom je správna voľba metód kľúčovým krokom (tab. 1.).

Nedostatky pri momentálne používaných postupoch poskytujú široký priestor na vylepšenie metód. Zamedzenie straty materiálu pri príprave vzoriek, či väzbe kyslých peptidov na častice pri

obohacovacích technikách sú problémy, ktoré je nutné riešiť. Nemenej dôležitými sú i obmedzenia v MS analýze a bioinformatických aplikáciách. Rovnako aj zdokonaľovanie starých a vývoj nových metód a programov na analýzu môže rapídne prispieť k vylepšeniu detekcie a identifikácie proteínov.

Literatúra

1. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 2009; 9(6): 1451–1468. doi: 10.1002/pmic.200800454.
2. Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 1990; 499: 177–196.
3. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON et al. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4(7): 873–886.
4. Oda Y, Huang K, Cross FR et al. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(12): 6591–6596.
5. Gygi SP, Rist B, Gerber SA et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnol* 1999; 17: 994–999.
6. Sap KA, Demmers JA (eds). *Labeling Methods in Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics* [monograph on the Internet]. *Integrative Proteomics*; 2012 [cited 2014 January 3]. Available from: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/29631.pdf>.
7. Hsu JL, Rist B, Chow NH et al. Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal Chem* 2003; 75(24): 6843–6852.
8. Boersema PJ, Aye TT, van Veen TA et al. Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. *Proteomics* 2008; 8(22): 4624–4632. doi: 10.1002/pmic.200800297.
9. Thompson A, Schäfer J, Kuhn K et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem* 2003; 75(8): 1895–1904.
10. Ross PL, Huang YN, Marchese JN et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3(12): 1154–1169.
11. Licker V, Patel V, Ward M (eds). *Characterisation of human cerebrospinal fluid (CSF) after tandem mass tag (TMT0) labelling* [monograph on the Internet]. Université de Genève; 2008 [cited 2014 January 3]. Available from: http://www.mpb.unige.ch/reports/rap_VirginieLicker.pdf.
12. Nita-Lazar A, Saito-Benz H, White FM. Quantitative phosphoproteomics by mass spectrometry: past, present, and future. *Proteomics* 2008; 8(21): 4433–4443. doi: 10.1002/pmic.200800231.
13. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389(4): 1017–1031.
14. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009; 6(5): 359–362. doi: 10.1038/nmeth.1322.
15. Btk.fi [homepage on the Internet]. Turku: Centre for Biotechnology, Finland [cited 2014 January 5]. Available

from: http://www.btk.fi/fileadmin/Page_files/proteomics/PDF-files/Protocols/In_solution_trypsin_digestion.pdf.

16. Vgn.uvm.edu [homepage on the Internet]. Vermont Genetics Network. University of Vermont [cited 2014 January]. Available from: http://vgn.uvm.edu/outreach/documents/Garfin_1EF_WebArticle9-07.pdf.
17. Nationaldiagnostics.com [homepage on the Internet]. Atlanta: National Diagnostics; Georgia; c2011 [cited 2014 January 5]. Available from: <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/staining-protein-gels-coomassie-blue>.
8. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006; 1(6): 2856–2860.
19. Alpert AJ. Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. *Anal Chem* 2008; 80(1): 62–76.
20. Steen H, Jeganathirajah JA, Rush J et al. Phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5(1): 172–181.
21. Swaney DL, McAlister GC, Coon JJ. Decision tree-driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics. *Nat Methods* 2008; 5(11): 959–964. doi: 10.1038/nmeth.1260.
22. Molina H, Horn DM, Tang N et al. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(7): 2199–2204.
23. Sweet SM, Bailey CM, Cunningham DL et al. Large scale localization of protein phosphorylation by use of electron capture dissociation mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8(5): 904–912. doi: 10.1074/mcp.M800451-MCP200.
24. Uniprot.org [homepage on the Internet] Uniprot, c2002–2014 [cited 2014 January 5]. Available from: <http://www.uniprot.org/>.
25. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. Sequest algorithm publication: an approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 1994; 5(11): 976–989. doi: 10.1016/1044-0305(94)80016-2.
26. Taus T, Köcher T, Pichler P et al. Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *J Proteome Res* 2011; 10(12): 5354–5362. doi: 10.1021/pr200611n.
27. MaxQuant.org [homepage on the Internet]. MaxQuant. Max planck institute of biochemistry. Martinsried: Germany; c2013 [cited 2014 January 7]. Available from: <http://www.maxquant.org/>.
28. Skyline.gs.washington.edu [homepage on the Internet]. MacCoss Lab Software. Washington: University of Washington, Seattle; c2014 [cited 2014 January 7]. Available from: <https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=de-faude>.
29. Ingenuity.com [homepage on the Internet]. Ingenuity. CA: Redwood City [cited 2014 January 7]. Available from: <http://www.ingenuity.com/>.
30. David.abcc.ncifcrf.gov [homepage on the Internet]. DAVID Bioinformatics Resources 6.7. National Institute of allergy and infectious diseases, Frederick, MD [cited 2014 January 7]. Available from: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>.
31. van Iersel MP, Kelder T, Pico AR et al. Presenting and exploring biological pathways with PathVisio. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 399. doi: 10.1186/1471-2105-9-399.

Nové trendy ve studiu glykosylace proteinů u onkologických onemocnění

New Trends in the Study of Protein Glycosylation in Oncological Diseases

Zahradníková M., Hernychová L., Vojtěšek B., Novotný M. V.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Glykomika a glykoproteomika představují relativně nové směry pro analýzy komplexních biologických vzorků a jejich důležitost neustále roste. Tyto oblasti jsou komplementární k dalším zavedeným přístupům, např. ke genomickému profilování a proteomice. Glykoproteiny jsou stále více uznávány jako důležité molekuly účastníci se buněčných interakcí a adhezí. Výskyt strukturních změn v glykanových částech se zdá být typický pro různé typy rakoviny. Následující souhrn se zabývá aktuálními trendy v glykomičtém profilování a glykoproteomickém výzkumu biologických tekutin a tkání se zaměřením na rakovinu. Použité metody jsou založeny na principech kapilárních separačních technik, hmotnostní spektrometrie a glykanových a lektinových čipů. Všechny zmíněné metody mají značný potenciál pro využití v diagnostických a prediktivních vyšetřeních.

Klíčová slova

glykomika – glykopeptidy – rakovina – kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie – kapilární elektroforéza – glykanové profilování – čipové analýzy

Summary

Glycomics and glycoproteomics represent relatively new directions in detail analyses of complex biological media. These areas of increasing importance to cancer research complement the more established genomic profiling and proteomics. Glycoproteins are being increasingly recognized as important in cellular interactions and adhesion. Structural alterations of their glycan moieties seem to occur in different cancer conditions. We review current directions in glycomic profiling and glycoproteomic investigations of biological fluids and tissues pertaining to cancer. The used methods rely on capillary separation techniques, mass spectrometry, and the glycan and lectin arrays. They all show considerable promise for new diagnostic and prognostic measurements.

Key words

glycomics – glycopeptides – cancer – liquid chromatography – mass spectrometry – capillary electrophoresis – glycan profiling – array analysis

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



prof. RNDr. Miloš V. Novotný, DrSc.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: milos.novotny@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 21. 3. 2014
Přijato/Accepted: 10. 4. 2014

v současné době rozvíjeny oblasti glyko-proteomiky zabývající se studiem glyko-konjugátů např. glykoproteinů, glykolipidů a glykomiky, která se zaměřuje na studium sacharidových složek [7,8]. Tyto pokročilé techniky se stále více uplatňují při řešení řady otázek týkajících se dalšího rozvoje výzkumu rakoviny.

Metodické pokroky ve výzkumu glykobiologie byly v poslední době zhodnoceny Národní radou pro výzkum ve zprávě pro americkou vládu [9]. Zpráva obsahuje naléhavé sdělení vybízející ke koordinaci výzkumných pracovišť v této oblasti, neboť glykokonjugáty hrají rozhodující roli v mnoha oblastech lidského zdraví, včetně zánětlivých onemocnění a rakoviny. Předpokládá se, že výsledky současného výzkumu v nádorové glykobiologii přinesou identifikaci nových biomarkerů vhodných nejen pro včasnou diagnostiku a prognostiku onemocnění, ale také pro potenciální vývoj nových farmaceutických přístupů k léčbě onemocnění.

Tento článek hodnotí současné pokroky v glykomice a glykoproteomice zaměřené na hledání biomarkerů rakoviny a poukazuje na rozdíly v expresi sacharidových struktur, které mohou pomoci rozlišit nádorové buňky od normálních. Hlubší poznatky o glykomu rakoviny mohou rovněž vést k novým způsobům léčby [10].

Současné pokroky v systémové glykobiologii

Biologické vzorky, jako je krevní sérum, cystická tekutina, tkáňové buňky atd., jsou typické materiály použité pro klinicky relevantní měření i pro výzkum nových nádorových biomarkerů. Jsou zdrojem proteinů a různých metabolických produktů přítomných ve velmi rozdílných koncentracích a formách. Při těchto typech analýz však vyvstávají následující otázky, na něž současná věda hledá odpovědi. Které složky jsou ale nevhodnější pro diagnostiku a prognostiku? Jsou specifické pro různé typy nádorů a stadium jejich progresu? Jak těžké je bude analyzovat?

I když je již prokázáno, že nádorové buňky se vyznačují neobvyklými typy glykosylací, není známo, jakým způsobem se to projeví v biologických te-

kutinách. Současný výzkum ukázal některé rozdíly na úrovni glykoproteinů – tvorbě glykanů v různých typech nádorů [11–15]. Nicméně není stále jasné, které proteiny nesou tyto modifikace, protože ve výše uvedených studiích byly měřeny glykany, jež byly enzymaticky nebo chemicky odštěpeny z biologických vzorků. Není také zatím ověřeno, zda mohou mít naměřené rozdíly v glykomických profilech nádorové tkáně nebo okolní tkáně či některých glykoproteinech přítomných v oběhovém systému souvislost s imunitní odpovědí organismu anebo s procesem zánětlivé či akutní fáze. Přesná glykomická měření tedy představují první krok ve strategii glykoproteomického výzkumu, jehož cílem je identifikace a strukturní charakterizace biomarkerů z řad molekul glykoproteinů.

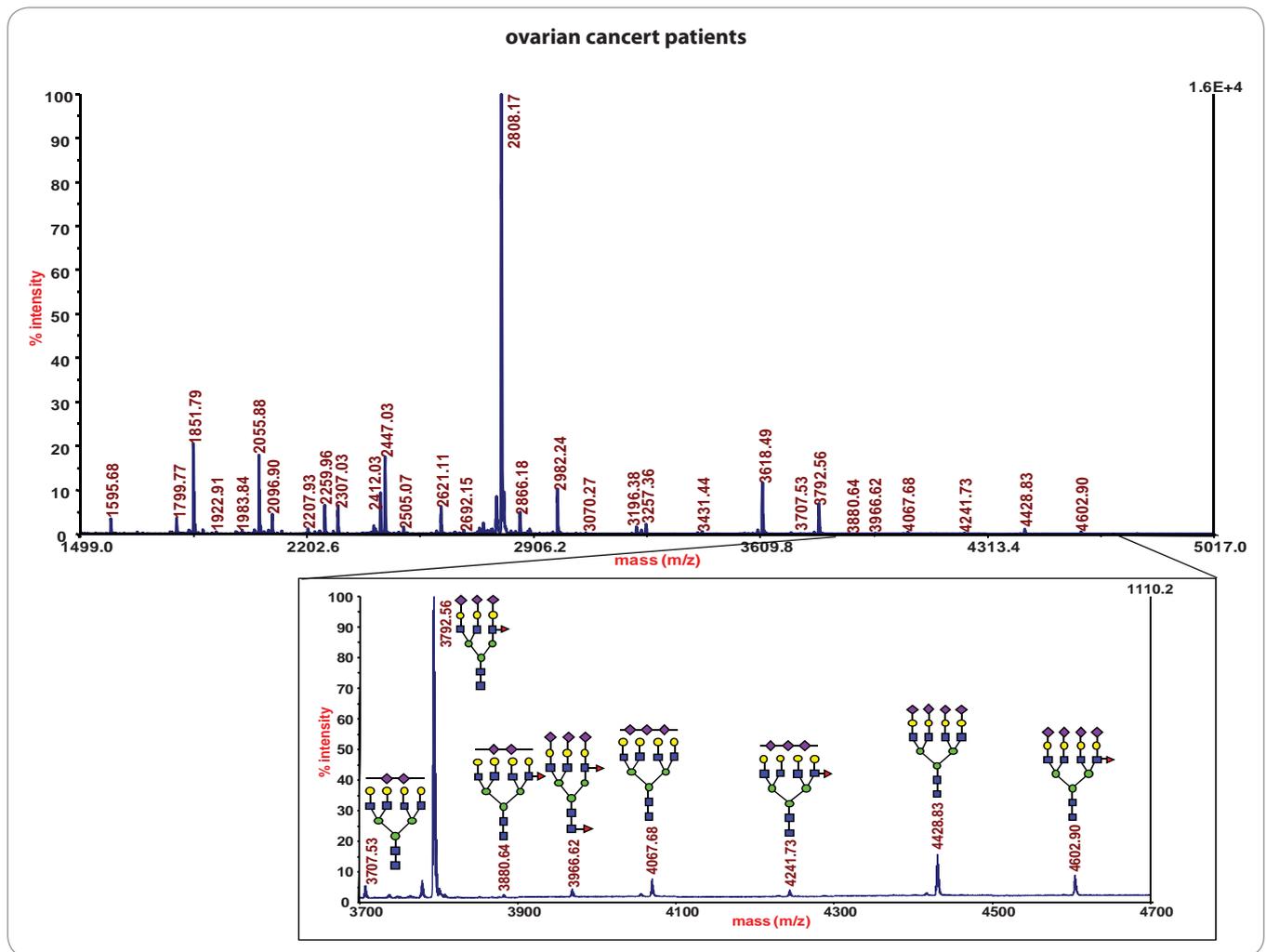
Všechny rychle se rozvíjející „omics“ přístupy poskytují komplexní analytická data, která musí být v konečném důsledku redukována a srozumitelně interpretována, aby v tomto směru umožnila vývoj jednoduchých detekčních postupů přijatelných pro použití v klinické praxi. Na druhé straně zpracování takových dat vyžaduje výkonné výpočetní nástroje (bioinformatiku) a jejich vývoj v oblasti glykomiky a glykoproteomiky je taktéž centrem mezinárodního úsilí [16]. Analytické postupy glykomiky a glykoproteomiky, podrobněji popsané níže, jsou primárně založeny na metodách kapilární kapalinové chromatografie, kapilární elektroforózy a různých typů hmotnostní spektrometrie. Společně představují účinný přístup pro analýzu komplexních biologických směsí umožňující odhalit rozdíly na molekulární úrovni mezi fyziologickou a patologickou homeostázou. Biochemická individualita různých pacientů [17] spojená se statisticky významnými rozdíly ve složité struktuře proteinů či metabolitů měřených ve vzorcích získaných od různých jedinců musí být statisticky vyhodnocena v duchu systémové biologie, aby mohly být získány onkologicky relevantní informace z extrémně komplexního pozadí, z tzv. biologického šumu. Statistické hodnocení definovaných skupin může pomoci vytvořit charakteristické „glykorisy“ nebo vzory

kvantitativně odlišných glykanů v rámci strukturní skupiny (v závislosti na substituci sacharidu či jeho větvení, vazby atd.).

Jestliže glykany s příslušnou strukturou nebo typem struktury mohou samy o sobě poskytovat diagnosticky důležité informace, je zároveň rozumné zvážit jejich strukturní a/nebo funkční vztahy k jejich vazebným proteinovým partnerům. Stejně jako je dnes jasné, že v sérech pacientů s rakovinou jsou přítomny protilátky, které se mohou vázat ke glykanům a některým glykoproteinům [18], pak i detekce anti-rakovinných glykokonjugátových protilátek v sérech pacientů může být v budoucnosti důležitá pro diagnostické a prognostické metody. Populární aplikací těchto principů jsou glykanové čipy [19,20], o kterých bude pojednáno později.

Na rozdíl od biologických mechanismů, které udávají strukturu, funkci a informační obsah nukleových kyselin a proteinů, je biosyntéza glykanů komplexní beztemplátový proces, ve kterém počet a enzymatická aktivita glykosyltransferáz a glykosylhydroláz (lokalizovaných v různých specifických buněčných organelách) mohou vzájemně spolupracovat. I když mnohé geny související s glykany byly důkladně prostudovány [21], mnohem obsáhlejší informace o glykomu (souhrn glykanových struktur v proteomu) byly získány ze současných studií. Ve světle dnešních vědomostí o nádorové glykobiologii [22,23] je nutné zvážit i provedení dalších rozsáhlých transkriptomových profilování.

Význam glykosylovaných struktur v mnohých složitých funkcích imunitního systému je v současnosti poměrně dobře znám [24,25]. Různé typy buněk nesoucí glykoproteiny s N- a O-vázanými glykany se účastní přirozené i adaptivní imunity, významné změny ve struktuře oligosacharidů jsou spojeny s buněčnou diferenciací, aktivací a smrtí. Buněčné rozpoznávání a vazba klíčových proteinů (známých jako „siglecs“ – imunoglobulin typu lektin vázající sialovou kyselinu, lektiny C-typu a galektiny) zahrnují změny v sialylaci a fukosylaci v imunologicky aktivních buňkách. Zatímco zánět, rakovina a imunologické procesy jsou propojeny v soubor komplexních mo-



Obr. 2. Glykanového profilování vzorků séra pacientek s nádorem vaječníků.

Spektra byla získána z hmotnostního spektrometru s MALDI ionizací. Ve výřezu spektra jsou zajímavé hybridní glykanové tříantenní struktury obsahující N-acetyl-glukosamin nahrazující manosu připojený na jádro N-glykanů. Podle těchto hybridních struktur glykanů lze rozdělit pacientky do definovaných skupin. Převzato z [13].

lekulárních a buněčných interakcí [26], monitorování hladin glykanů a/nebo klíčových glykopeptidů v tělních tekutinách je stále významné pro molekulární onkologii. Glykanové profilování a glykoproteomický výzkum tak doplňují zavedené „omics“ přístupy, jako je genomika, proteomika a metabolomika, a společně s interaktivním využitím glykoproteomiky a bioinformatických nástrojů systémové biologie představují značný potenciál pro výzkum rakoviny.

Glykomické profilování biologických tekutin a tkání

Záměrem glykomického profilování je zobrazit co nejvíce strukturně odlišných glykanových typů a změřit jejich rela-

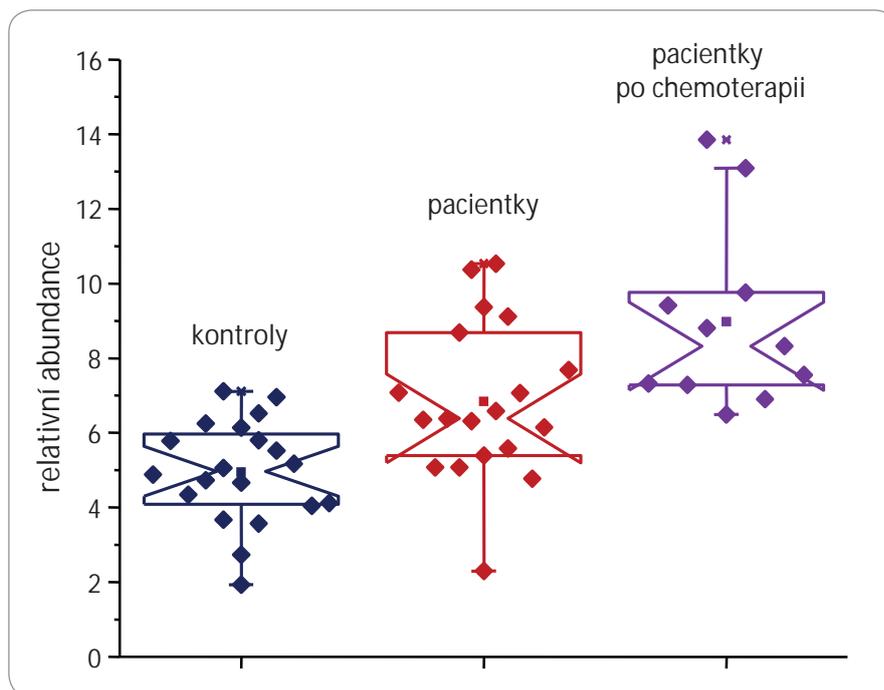
tivní koncentrace v biologických vzorcích. To je v současnosti relativně jednoduchý úkol, pokud je vzorkem izolovaný glykoprotein. Jedná-li se ovšem o měření glykanových profilů ve směsi glykoproteinů, např. krevní sérum nebo plazmatických proteinů, jde o úkol technicky mnohem náročnější. A to zejména pokud jde o velmi citlivé měření (nižší než pikomolární množství), neboť standardní obsah glykoproteinů v séru je odhadován přibližně na 1 % [27]. Před vlastní analýzou (kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie nebo kapilární elektroforéza) musí být glykany uvolněny a extrahovány z příslušných proteinů a separovány od ostatních interferujících látek. Selektivita

a citlivost dalších měření jsou často zvyšovány vhodnou mikrochemickou modifikací glykanových analytů. Zatímco doposud nebyly vyvinuty žádné obecné protokoly týkající se glykomického profilování, předními glykobiologickými laboratořemi jsou publikovány pouze vlastní metody (jejich přehled je uveden v [28]). Profilování N-glykanů a O-glykanů se liší typem uvolňování glykanů z proteinů – enzymatické štěpení se používá pro N-glykany, zatímco O-glykany vyžadují uvolnění pomocí mikrochemických postupů. V praxi se komparativní glykomické profilování s vyhodnocováním dat od zdravých a nemocných příliš neliší od jiných přístupů používaných v systémové biologii a „omics“ techni-

kách. Glykomika má několik výhod ve srovnání s proteomikou – „užší“ dynamické rozpětí koncentrací ($\sim 10^3$ u glykomiky a 10^6 – 10^{10} u proteomiky) a rychlejší analytické postupy s možností sestavení do multiplexu, ve kterém lze sledovat více signálů najednou. Při komparativních studiích nádorových biomarkerů je však nezbytné zajistit reprodukovatelnost ve všech jednotlivých analytických krocích: 1. uvolnění glykanů, 2. extrakce a purifikace, 3. derivatizace a 4. vlastní profilovací měření. Derivatizace glykanů spočívá v nahrazení vodíků za metylové skupiny, což je velmi výhodné pro měření na hmotnostních spektrometrech, kde takto upravené glykany snadněji ionizují.

Tři hlavní přístupy jsou používány v glykomickém profilování: 1. hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry – MS), 2. kapalinová chromatografie (liquid chromatography – LC) s fluorescenční detekcí a 3. kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis – CE) s laserově indukovanou fluorescenční detekcí. MS analýza může nebo nemusí používat derivatizaci vzorků, i když bylo mnohokrát prokázáno, že permytylace na pevné fázi [29] přináší jasné výhody co do zvýšené citlivosti a zahrnutí neutrálních i kyselých glykanových struktur v jednom analytickém měření. Různé detekční strategie pro LC a CE využívají mikrochemické navázání fluoroforu ke glykanům, které jinak neobsahují jednoduše detekovatelné motivy ve svých molekulách. Prostřednictvím rozlišení glykanů v čase a prostoru mohou některé LC a CE přístupy rozlišit glykanové izomery, např. u izomerické sialylace a fukosylace, což se zdá být velmi důležité při objevování nádorových biomarkerů. V současné době je značně náročné rozlišit glykanové izomery použitím technik založených pouze na MS.

Důležité kritérium při výběru metody pro glykanové profilování je počet profilových komponent, které mohou být pravidelně monitorovány s dobrou citlivostí a reprodukovatelností. Zatímco LC/fluorescenční detekce je široce a úspěšně používána na mnohých vzorcích v rámci studií týkajících se dědičnosti a chorob v různých lidských populacích [30,31], všeobecný postup profilování je omezen

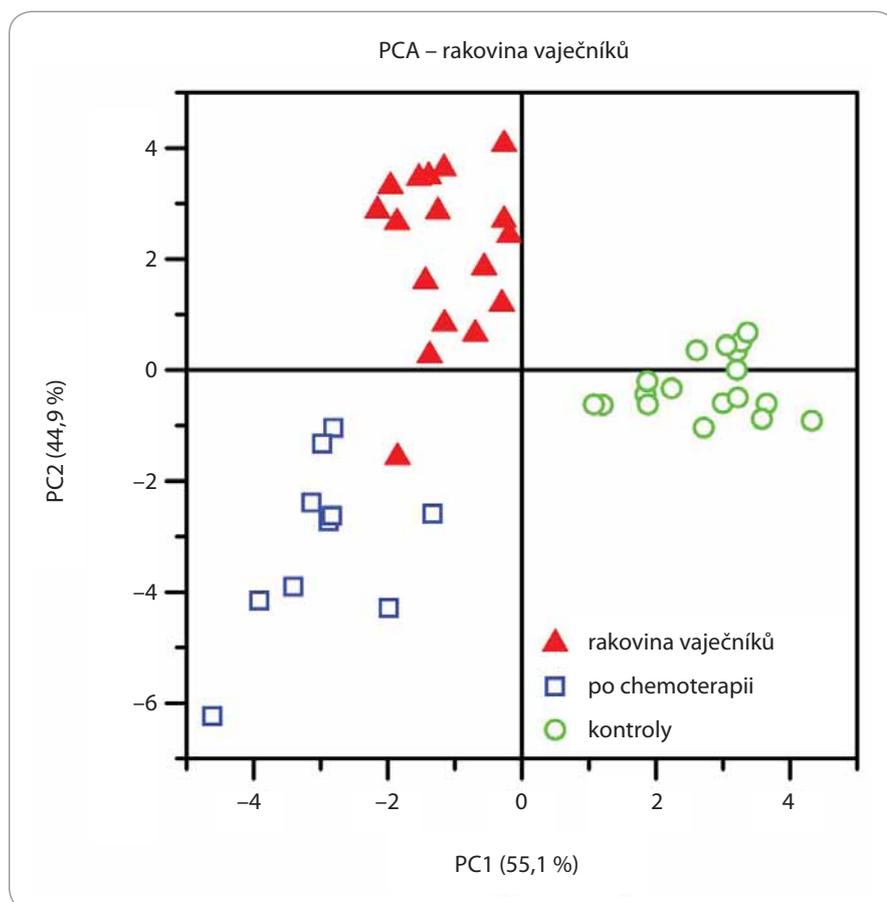


Obr. 3. Statistická analýza N-vázaných tříantenních glykanů přítomných v sérech pacientek s rakovinou vaječníků, pacientek se stejným onemocněním po chemoterapii a s kontrolními jedinci. Převzato z [13].

na hlavní glykany uvolněné z imunoglobulinů a jiných proteinů přítomných v lidském séru ve vyšších koncentracích. Tyto glykany pak musí být strukturně ověřeny pomocí MS. Naopak metody založené na MS principech mohou změřit okolo 100 glykanových struktur a identifikovat je z jejich charakteristických spekter [7]. Pomocí nejpokročilejších CE postupů je možno rutinně monitorovat podobné množství glykanů, i když ještě ne všechny profily glykanových komponent byly pozitivně identifikovány.

Ve studiích rakoviny bylo glykomické profilování založené na MS s využitím ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption-ionization – MALDI) úspěšně aplikováno při studiu glykanových směsí z metastatických karcinomů prostaty [11]. Ukázalo se rovněž být slibným přístupem při určení stadia nádorového onemocnění mléčné žlázy [32] a zvýraznilo další glykanové profily u rakoviny jícnu [33], jater [12,34], vaječníků [13], plic [14] a tlustého střeva [15]. Příklady glykanového profilování vzorků sér pocházejících od pacientek s nádorem vaječníků založeného na MALDI/MS jsou znázorněny na obr. 2, 3.

I když jsou vzorky sér jednotlivých pacientek profilované, kvantifikované a normalizované pomocí standardů, každý normalizovaný profil reprezentuje určitý vzor (příklad je uveden na obr. 2), který je statisticky porovnáván s jinými záznamy dané skupiny a séry z kontrolní skupiny bez diagnostikovaného zkoumaného onemocnění u stejného věku pacientů. Glykanové vzory jsou následně statisticky hodnoceny pomocí chemometrických postupů, např. analýza hlavních komponent a náhodná strategie vzorků s rekurzivním výběrem funkce založeným na podpůrných vektorových přístrojích [35]. Vybrané komponenty nebo skupiny glykanů mohou být pro jednotlivé skupiny pacientů dále evaluovány pomocí statisticky relevantních kritérií společných pro klinické laboratoře, např. p-hodnoty nebo ROC analýza (receiver operating characteristic AUC). To ilustruje obr. 3 v rámci srovnání skupin 19 pacientek s rakovinou vaječníků, 11 pacientek se stejným onemocněním po chemoterapii [13] a 20 kontrolními jedinci. Srovnání na obr. 3 se vztahuje na N-vázané tříantenní glykany, které odlišují zdravé jedince od pacientek s rakovinou. Vložený výřez spektra v obr. 2 uka-



Obr. 4. PCA statistické vyhodnocení glykanových map získaných po separaci kapilární elektroforézou umožňuje rozdělení vzorků do odlišných kohortních skupin (stejně skupiny pacientek a kontrol jako u obr. 3). Převzato z [13].

zuje struktury považované za významné z hlediska rozdělení skupin pacientů.

V různých profilovacích studiích (mikročipová CE s laserově indukovanou fluorescenční detekcí) sér pacientek s rakovinou vaječnicků [36] byl rovněž prokázán význam použití počítačových technik pro rozeznávání vzorů při práci s komplexními daty (obr. 4). V tomto případě glykanové mapy založené na CE se celkem zřetelně seskupují do odlišných kohortních skupin. Postupy založené na CE mikročipech tak vykazují značný potenciál pro budoucí klinické využití.

Přestože je většina aplikací glykomiky ve výzkumu rakoviny založena na analýze malých objemů krevního séra nebo plazmy (často jde o vzorky s objemem 1 μ l), může být glykomické profilování aplikováno také na jiné biologické materiály, např. tekutiny z cyst [37] nebo buněčné nádorové linie [38], je však potřeba modifikovat protokol extrakce.

Obohacovací techniky a glykoproteomické přístupy

Je známo, že glykosylační profily se významně mění při ontogenezi, třeba zvýšená aktivita N-acetylglukosaminyltransferázy V (enzym zodpovědný za tvorbu větvených N-vázaných glykanů) bývá spojována s nádorovou invazí a metastazováním určitých typů nádorů [39]. Předpokládá se, že glykoproteiny vylučované nádory mohou být použity jako potenciální diagnostické markery. Jeden z nejlépe definovaných biomarkerů rakoviny je PSA (prostatický specifický antigen), glykoprotein s jedním definovaným N-vázaným místem glykanové substituce, jež je primárně vylučován prostatickými epiteliálními buňkami do semenné plazmy. Bylo prokázáno, že glykanová část u zdravých jedinců a pacientů s diagnostikovanou rakovinou prostaty se liší [40]. Nádorově specifické změny glykanových struktur by

mohly být dále využity pro nádorovou imunoterapii. Za příklad může posloužit jejich použití jako epitopů pro terapeutické monoklonální protilátky [41]. Významnou měrou se na získávání nových poznatků podílejí metodiky obohacení vzorku o glykoproteiny, které se opírají o tři základní přístupy: 1. chemické metody, 2. lektinovou afinity chromatografii a 3. adsorpci na modifikovaný křemenný povrch [42].

Chemické metody jsou prezentovány dvěma přístupy: 1. hydrazidovou chemií a 2. chemií kyseliny borité. Oba přístupy využívají přítomnosti cis-diolů v monosacharidech. Metodika hydrazidové chemie spočívá v oxidaci NaIO_4 cis-diolů na aldehydy, na které jsou následně kovalentně vázány funkční partikule s hydrazidovou skupinou. Takto označené glykoproteiny jsou pak *in situ* štěpeny trypsinem, zatímco neglykosylované i nenavázané proteiny jsou promytím odstraněny. Posledním krokem je uvolnění proteinové části glykoproteinu pomocí enzymu PNGasy F a analýza na LC-MS/MS. Metodika kyseliny borité je založena na její schopnosti vytvářet heterocyklické diestery pro kovalentní zachycení glykoproteinů následované elucí okyselením [43].

S využitím hydrazidové chemie byly analyzovány vzorky pleurálního výpotku pacientů s rakovinou plic. I přes nízké koncentrační rozmezí proteinů, které se pohybovalo v řádech $\mu\text{g/ml}$ až ng/ml , se podařilo identifikovat několik proteinů (např. CA-125, CD44 nebo CD166) spojených s progresí nádoru nebo jeho schopností metastazovat [44].

Lektiny představují širokou skupinu proteinů velmi specificky se vázajících na vybrané monosacharidové zbytky nebo jejich funkční skupiny [45]. Princip lektinové afinity chromatografie spočívá v zakotvení vybraných lektinů na pevný nosič, kterým může být agaróza, magnetické partikule, čipy, sílika a další materiály [46], a následné separaci glykanů z komplexní biologické směsi. Řada současných studií prokázala, že glykoproteiny ovlivňující nádorová onemocnění mohou být identifikovány přímo ze séra nebo z plazmy. Při srovnávací studii glykosylačního profilu jedinců s adenokarcinomem plic a zdra-

vých kontrol bylo pomocí lektinů z obilných klíčků (wheat germ agglutinin – WGA) z odebraných sér identifikováno 39 glykoproteinů vykazujících rozdílné zastoupení mezi sledovanými skupinami. Byly nalezeny tři glykoproteiny ve zvýšené koncentraci (adiponektin, ceruloplasmin a glykofosfatidyl-inositol-80) a dva glykoproteiny ve snížené koncentraci (cyclin H a Fyt) přímo související s vývojem adenokarcinomu plic, které by mohly být užitečné pro včasnou detekci onemocnění nebo sledování jeho progresu [47].

Pomocí vhodně zacílené lektinové extrakce byly identifikovány hyper-fukosylované proteiny, např. hemopoexin [48], využitelné v diagnostice onemocnění. Třetí přístup vhodný pro účely glykoproteomiky je použití komerčně vyráběných mikrokolon Nukleosil 4000-7 (Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany), které fungují na principu aniontového výměníku pro separaci proteinů a peptidů. Vhodnost mikrokolon je dána především chemickou inertností vůči zkoumanému vzorku (nedochází k nespecifické adsorpci jiných proteinů), kompaktností při užití HPLC (high performance liquid chromatography) a v neposlední řadě i velkým poměrem povrchu k objemu i pevností SiO₂ [49].

Čipové technologie

V mnoha oblastech biologie a medicíny je důležité pochopení interakcí glykan-protein. K tomu slouží glykanové mikročipy, které na svém povrchu nesou ucelené sety (knihovny) glykanů [50–52]. Formát mikročipů umožňuje rychlou a simultánní analýzu afinity glykan-protein velkého množství odvozených glykanových struktur. Při použití tohoto přístupu mohou být stovky syntetických glykanů vloženy a imobilizovány na mikročipech a poté použity pro mapování glykoproteinů v biologických materiálech včetně detekce anti-glykanových protilátek v séru. K imobilizaci mohou alternativně posloužit i glykany izolované z přírodních zdrojů. Pak probíhá nejčastěji detekce fluorescenčně značených proteinů vázaných na povrchu terčů s následnou kvantifikací fluorescenčním skenerem. Různé charakteristiky glykanových čipů, včetně konstrukčních prvků, typů

povrchů a metod imobilizace, byly v literatuře již prodiskutovány [53–55]. Využití glykanových čipů představuje velký potenciál pro sérologickou detekci nádoru. Je však zřejmé, že komplexní data získaná z proteinových interakcí vyžadují použití sofistikovaných výpočetních nástrojů a algoritmů [56,57].

Lektinové čipy představují další variantu čipové technologie vhodné pro mapování biologických vzorků na přítomnost glykanových epitopů. Bylo prokázáno, že lektiny získané z rostlin vykazují vyšší selektivitu a vazebnou afinitu k určitým typům glykanů než lektiny rekombinantní. Pouze několik málo lektinů bylo uvedeno v článku z roku 2005 [58], avšak technologický pokrok [59] umožňuje podstatně zvýšit počet dostupných lektinů a v nedávno uveřejněných publikacích byly popsány aplikace lektinových čipů i ve výzkumu rakoviny [60,61]. V nejbližší budoucnosti se předpokládá dostupnost lektinů s lepšími specifitami. Mohou to být rekombinantní proteiny a anti-glykanové protilátky, které více zpřístupní lektinové čipy a jejich širší aplikace. Podobně i glykanové čipy jsou většinou limitovány dostupností syntetických glykanů, i když nedávné pokroky v syntéze sacharidů [62] a optimalizace purifikace neobvyklých glykanů z biologických zdrojů [63] mohou výrazně obohatit využití současných čipových postupů.

Závěr

Metody systémové biologie přispívají k objasnění původu lidských nemocí včetně rakoviny. Informace získané z různých studií vedou k vývoji diagnostiky, prognostiky a nových strategií léčby. Relativně nedávné poznatky ve výzkumu rakoviny jsou velkou měrou založeny na genomických a proteomických postupech, glykomických a glykoproteomických měřeních a vykazují značný potenciál pro budoucí směr bádání. I když se v oblasti glykoproteomiky a glykomiky vyskytuje celá řada metodologických problémů, doposud dosažené výsledky naznačují značný potenciál při léčbě některých typů rakoviny.

Poděkování patří Mgr. Evě Michalové a Mgr. Marianě Pjechové za textové korekce.

Literatura

- Hart GW, Copeland RJ. Glycomics hits the big time. *Cell* 2010; 143(5): 672–676. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.008.
- Aub JC, Sanford BH, Cote MN. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat agglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; 54(2): 396–399.
- Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy; new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(16): 10231–10233.
- Kobata A, Amano J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and applications for the diagnosis and immunotherapy of tumors. *Immunol Cell Biol* 2005; 83(4): 429–439.
- Ørntoft TF, Vestergaard EM. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis* 1999; 20(2): 362–371.
- Taniguchi N. Human disease glycomics/proteome initiative (HGPI). *Mol Cell Prot* 2008; 7(3): 626–627.
- Novotny MV, Alley WR Jr, Mann BF. Analytical glycobiochemistry at high sensitivity: current approaches and directions. *Glycoconjugate J* 2013; 30(2): 89–117. doi: 10.1007/s10719-012-9444-8.
- Novotny MV, Alley WR Jr. Recent trends in analytical and structural glycobiochemistry. *Curr Opin Chem Biol* 2013; 17(5): 832–841. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.05.029.
- National Research Council (US) Committee on Assessing the Importance and Impact of Glycomics and Glycosciences (eds). *Transforming glycoscience: a roadmap for the future* [monograph on the Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 2012 [cited 2014 January 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK109958/>.
- Hudak JS, Bertozzi CR. New advances inspire a reemergence of glycans in medicine. *Chemistry Biology* 2014; 21: 16–37. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.09.010.
- Kyselova Z, Mechref Y, Al Bataineh M et al. Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer. *J Proteome Res* 2007; 6(5): 1822–1832.
- Ressom HW, Varghese RS, Goldman L et al. Analysis of MALDI-TOF mass spectrometry data for discovery of peptide and glycan biomarkers of hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2008; 7(2): 603–610. doi: 10.1021/pr0705237.
- Alley WR Jr, Vasseur JA, Goetz JA et al. N-linked glycan structures and their expressions change in the blood sera of ovarian cancer patients. *J Proteome Res* 2012; 11(4): 2282–2300. doi: 10.1021/pr201070k.
- Vasseur JA, Goetz JA, Alley WR Jr et al. Smoking and lung cancer-induced changes in N-glycosylation of blood serum proteins. *Glycobiology* 2012; 22(12): 1684–1708. doi: 10.1093/glycob/cws108.
- Alley WR Jr, Svoboda M, Goetz JA et al. Glycomic analysis of sera derived from colorectal cancer patients reveals increased fucosylation of highly branched glycans. In press 2014.
- Hicks MG, Kettner C (eds). *Glyco-bioinformatics: cracking the sugar code by navigating the glycospace*. Frankfurt: Logos-Verlag 2012.
- Novotny MV, Soini HA, Mechref Y. Biochemical individuality reflected in chromatographic, electrophoretic and mass-spectrometric profiles. *J Chromatogr B* 2008; 866(1–2): 26–47.
- Volmers HP, Brärdlein S. Natural antibodies and cancer. *J Autoimm* 2007; 29(4): 295–302.
- Bovin N, Obukhova P, Shilova N et al. Repertoire of human natural anti-glycan immunoglobulins. Do we have auto-antibodies? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(9): 1373–1382.
- Rillahan CD, Paulson JC. Glycan microarrays for decoding glycome. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 797–823. doi: 10.1146/annurev-biochem-061809-152236.
- Taniguchi N, Honke K, Fukuda M (eds). *Handbook of glycosyltransferases and related genes*, Tokyo: Springer-Verlag 2002.

22. Nairn AV, York WS, Harris K et al. Regulation of glycan structures in animal tissues. Transcript profiling of glycan-related genes. *J Biol Chem* 2008; 283(25): 17298–17313. doi: 10.1074/jbc.M801964200.
23. Nairn AV, Moremen KW. Glycotranscriptomics. In: Cummings RD, Pierce JM (eds). *Handbook of glycomics*. New York: Academic Press/Elsevier 2009: 95–135.
24. Redelinguys P, Crocker PR. Glycomics of the immune systems. In: Cummings RD, Pierce JM (eds). *Handbook of glycomics*. New York: Academic Press/Elsevier 2009: 237–261.
25. Kolarich D, Lepenies B, Seeberger PH. Glycomics, glycoproteomics and the immune system. *Curr Opin Chem Biol* 2012; 16(1–2): 214–220. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.12.006.
26. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140(6): 883–899. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
27. Narimatsu H, Sawaki H, Kuni A et al. A strategy for discovery of cancer glycol-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. *FEBS J* 2009; 277(1): 95–105. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07430.x.
28. Alley WR Jr, Mann BF, Novotny MV. High-sensitivity analytical approaches for the structural characterization of glycoconjugates. *Chem Rev* 2013; 113(4): 2668–2732. doi: 10.1021/cr3003714.
29. Alley WR Jr, Madera M, Mechref Y et al. Chip-based reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of permethylated glycans: a potential methodology for cancer-biomarker discovery. *Anal Chem* 2010; 82(12): 5095–5106. doi: 10.1021/ac100131e.
30. Knezevic A, Gornik O, Polasek O et al. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiol* 2010; 20(8): 959–969. doi: 10.1093/glycob/cwq051.
31. Lauc G, Essafi A, Huffman JE et al. Genomics meets glycomics – the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1a as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet* 2010; 6(12): e1001256. doi: 10.1371/journal.pgen.1001256.
32. Kyselova Z, Mechref Y, Kang P et al. Breast cancer diagnosis and prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles. *Clin Chem* 2008; 54(7): 1166–1175. doi: 10.1373/clinchem.2007.087148.
33. Mechref Y, Hussein A, Bekesova S et al. Quantitative serum glycomics of esophageal adenocarcinoma and other esophageal disease onsets. *J Proteome Res* 2009; 8(6): 2656–2666. doi: 10.1021/pr8008385.
34. Kang P, Madera M, Alley WR Jr et al. Glycomic alterations in the highly-abundant and lesser-abundant blood serum protein fractions for patients diagnosed with hepatocellular carcinoma. *Int J Mass Spectrom* 2011; 305(2–3): 185–198.
35. Tang Z, Varghese RS, Bekesova S et al. Identification of N-glycan serum markers associated with hepatocellular carcinoma from mass spectrometry data. *J Proteome Res* 2010; 9(1): 104–112. doi: 10.1021/pr900397n.
36. Mitra I, Alley WR Jr, Goetz JA et al. Comparative profiling of N-glycans isolated from serum samples of ovarian cancer patients and analyzed by microchip electrophoresis. *J Proteome Res* 2013; 12(10): 4490–4496. doi: 10.1021/pr400549e.
37. Mann BF, Goetz JA, House MG et al. Glycomic and proteomic profiling of pancreatic cyst fluids identifies hyperfucosylated lactosamines on the N-linked glycans of overexpressed glycoproteins. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(7): M111.015792. doi: 10.1074/mcp.M111.015792.
38. Goetz JA, Mechref Y, Kang P et al. Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells. *Glycoconj J* 2009; 26(2): 117–131. doi: 10.1007/s10719-008-9170-4.
39. Siddiqui SF, Pawelek J, Handerson T et al. Coexpression of {beta}1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V glycoprotein substrates defines aggressive breast cancers with poor outcome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(11 Pt 1): 2517–2523.
40. Peracaula R, Tabares G, Royle L et al. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology* 2003; 13(6): 457–470.
41. Schietinger A, Philip M, Yoshida BA et al. A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen. *Science* 2006; 314(5797): 304–308.
42. Wei X, Li L. Comparative glycoproteomics: approaches and applications. *Brief Funct Genomics Proteomic* 2009; 8(2): 104–113. doi: 10.1093/bfpg/eln053.
43. Drake M, Cho W, Li B et al. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clin Chem* 2010; 56(2): 223–236. doi: 10.1373/clinchem.2009.
44. Soltermann A, Ossola R, Kilgus-Hawelski S et al. N-glycoprotein profiling of lung adenocarcinoma pleural effusions by shotgun proteomics. *Cancer* 2008; 114(2): 124–133. doi: 10.1002/cncr.23349.
45. Larkin A, Imperiali B. The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation. *Biochemistry* 2011; 50(21): 4411–4426. doi: 10.1021/bi200346n.
46. Balonova L, Hernychova L, Bilkova Z et al. „Sladký“ svět bakterií: metodické přístupy využívané v analýze bakteriálních glykoproteinů. *Vojenské zdravotnické listy* 2010; 74(2): 54–59.
47. Hongsachart P, Huang-Liu R, Sinchaikul S et al. Glycoproteomic analysis of WGA-bound glycoprotein biomarkers in sera from patients with lung adenocarcinoma. *Electrophoresis* 2009; 30(7): 1206–1220. doi: 10.1002/elps.200800405.
48. Tian Y, Zhang H. Glycoproteomics and clinical applications. *Proteomics Clin Appl* 2010; 4(2): 124–132. doi: 10.1002/prca.200900161.
49. Svoboda M, Mann BF, Goetz JA et al. Examination of glycan profiles from IgG-depleted human immunoglobulins facilitated by microscale affinity chromatography. *Anal Chem* 2012; 84(7): 3269–3277. doi: 10.1021/ac203336u.
50. Fukui S, Feizi T, Galustian C et al. Oligosaccharide microarrays for high-through-out detection and specificity assignment of carbohydrate-protein interactions. *Nat Biotechnol* 2002; 20(10): 1011–1017.
51. Houseman BT, Mrksich M. Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification. *Chem Biol* 2002; 9(4): 443–454.
52. Fazio F, Bryan MC, Blixt O et al. Synthesis of sugar arrays in microtiter plate. *J Am Chem Soc* 2002; 124(48): 14397–14402.
53. Rillahan CD, Paulson JC. Glycan microarrays for decoding the glycome. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 797–823. doi: 10.1146/annurev-biochem-061809-152236.
54. Smith DF, Song X, Cummings RD. Use of glycan microarrays to explore specificity of glycan-binding proteins. *Methods Enzymol* 2010; 480: 417–444. doi: 10.1016/S0076-6879(10)80033-3.
55. Liu Y, Palma AS, Feizi T. Carbohydrate microarrays: key developments in glycobiology. *Biol Chem* 2009; 390(7): 647–656. doi: 10.1515/BC.2009.071.
56. Huflejt ME, Vuskovic M, Vasiliu D et al. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Mol Immunol* 2009; 46(15): 3037–3049. doi: 10.1016/j.molimm.2009.06.010.
57. Vuskovic MI, Xu H, Bovin NV et al. Processing and analysis of serum antibody binding signals from Printed Glycan Arrays for diagnostic and prognostic applications. *Int J Bioinf Res App* 2011; 7(4): 402–426. doi: 10.1504/IJBRA.2011.043771.
58. Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S et al. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat Methods* 2005; 2(11): 851–856.
59. Ribeiro JP, Mahal LK. Dot by dot: analyzing the glycome using lectin microarrays. *Curr Opin Biol Chem* 2013; 17(5): 827–831. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.06.009.
60. Bird-Lieberman EL, Neves AA, Lao-Sirieix P et al. Molecular imaging using fluorescent lectin permits rapid endoscopic identification of dysplasia in Barrett's esophagus. *Nat Med* 2012; 18(2): 315–321. doi: 10.1038/nm.2616.
61. Gaziel-Sovran A, Segura MF, Di Micco R et al. MiR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell* 2011; 20(1): 104–118. doi: 10.1016/j.ccr.2011.05.027.
62. Wang Z, Chinoys ZS, Ambre SG et al. A general strategy for the chemoenzymatic synthesis of asymmetrically branched N-glycans. *Science* 2013; 341(6144): 379–383. doi: 10.1126/science.1236231.
63. Alley WR Jr, Mann BF, Hruska V et al. Isolation and purification of glycoconjugates from complex biological sources by recycling high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* 2013; 85(2): 10408–10416. doi: 10.1021/ac4023814.

Současné trendy ve využívání PET radiofarmak k onkologické diagnostice

Current Trends in Using PET Radiopharmaceuticals for Diagnostics in Oncology

Adam J.^{1,2}, Kadeřávek J.², Kužel F.², Vašina J.³, Řehák Z.^{1,3}

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² ÚJV Řež, a. s., Husinec-Řež

³ Oddělení nukleární medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Nukleární medicína je důležitým oborem moderní medicíny, zejména díky své roli v *in vivo* zobrazování důležitých procesů v lidském organismu. Toto je možné prostřednictvím využití radiofarmak, specifických látek značených radioaktivním nuklidem, jejichž distribuci v těle lze vizualizovat pomocí speciálních skenerů a na základě fyziologických zákonitostí interpretovat diagnózu. Pozitronová emisní tomografie (PET) je moderní a v mnoha směrech nepostradatelná metoda nukleární medicíny. Spektrum radiofarmak pro tuto metodu dostupných se v posledních letech zvyšuje díky koordinované snaze výrobců syntézních zařízení, chemiků i potenciálních uživatelů – lékařů. Článek se formou přehledového článku zabývá vývojem na poli PET radiofarmak v posledních pěti letech s ohledem na onkologické aplikace PET.

Klíčová slova

nukleární lékařství – pozitronová emisní tomografie – radiofarmaka – gallium-68 – uhlík-11 – fluor-18 – zirkonium-89

Summary

Nuclear medicine is an important field of modern medicine, particularly thanks to its role in *in vivo* imaging of important processes in human organism. This is possible thanks to the use of radiopharmaceuticals, specific substances labeled by radioactive nuclide, its distribution in the body can be visualized by specialized scanners and, based on the knowledge of physiological patterns, diagnosis can be determined. Positron emission tomography (PET) is a modern and in many ways indispensable method of nuclear medicine. The spectrum of radiopharmaceuticals available in recent years is broadening thanks to a coordinated effort of manufacturers of synthesis equipment, chemists and potential users – physicians. This review focuses on the development in the PET radiopharmaceutical field in the last five years, with an emphasis on oncological applications of PET.

Key words

nuclear medicine – positron-emission tomography – radiopharmaceuticals – gallium-68 – carbon-11 – fluorine-18 – zirconium-89

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805)

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCJ, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Ing. et Ing. Jan Adam, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: adam@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 2. 2014

Přijato/Accepted: 3. 4. 2014

Úvod

Pozitronová emisní tomografie (PET) je jedna z nejmodernějších metod molekulárního zobrazování, neinvazivní *in vivo* metoda umožňující lékařům studovat procesy v lidském těle prostřednictvím radioaktivně značených radiofarmak a velmi přesně tak diagnostikovat rozličné poruchy a neobvyklé úkazy. V kombinaci s výpočetní tomografií (CT) patří již přes 10 let ke stěžejním zobrazovacím metodám nejen onkologické diagnostiky. PET je nikoli pouze v onkologických aplikacích metoda s velmi příznivým poměrem ceny a efektivity, přispívá jak ke stanovení nebo určení diagnóz, tak i k vyhodnocování vhodnosti terapie či odezvy na léčbu, je důležitý faktor pro koncept takzvané personalizované medicíny. Vyniká především na poli určování metabolické aktivity nádorů, zhodnocení proliferace, vyhodnocení hypoxie tkáně, zejména nádorové, a posouzení hustoty receptorů exprimovaných v buňkách. Hnací silou metody PET je bezesporu [¹⁸F]fluorodeoxyglukóza (FDG), metabolický marker, díky němuž je možno v těle identifikovat místa s nepřírozně zvýšenou či naopak sníženou metabolickou aktivitou. FDG PET je v současnosti prakticky nenahraditelná diagnostická metoda pro detekci primárních tumorů a metastáz [1–4]. FDG nicméně trpí určitou nespecifičností – zvýšený příjem vykazují také např. místa s probíhajícím zánětlivým procesem, někdy je její příjem vyšší v hypoxických oblastech, některé orgány mají přirozeně vyšší příjem energie, atd. Na jedné straně je vysoce citlivá pro lokalizaci lézí, na druhé straně nemusí být nalezené místo s vyšším příjmem vždy tumorem. Omezena je i její schopnost posoudit odezvu na léčbu – nemusí odlišit hojící se tkáň od viabilního, proliferujícího nádoru. I to je důvod, proč byla za posledních 20 let vyvíjena jiná, specifitější radiofarmaka, která širokospektrálnosti glukózy sice nedosahují, přesto se hodí lépe pro některé specifitější aplikace. Vhodnou volbou značené látky lze monitorovat prakticky jakýkoli z hlediska onkologického pacienta zajímavý děj v organismu. Při vývoji nových radiofarmak je však zapotřebí uvážit mnoho dílčích faktorů – vhodně zvolit radio-

nuklid s ohledem na chemizmus látky, její farmakokinetiku, biologické chování, poločas interakce, ale také s ohledem na snadnost a výtěžek syntézy či dostupnost prekurzoru. Těžiště PET radiofarmak spočívalo a spočívá i nadále bude ve značení fluorem-18 a v menší míře také uhlíkem-11. Pokrok na poli syntézni a separační instrumentace ovšem otevírá čím dál více dveře značení pomocí kovových a jiných rozmanějších iontů, např. mědi-64 ($t_{1/2} = 12$ h), jodu-124 ($t_{1/2} = 100,32$ h), gallia-68 ($t_{1/2} = 68$ min) či zirkonia-89 ($t_{1/2} = 78$ h). Obecně lze říci, že čím delší je poločas přeměny určitého nuklidu, tím vhodnější je pro značení větších molekul – fluor, gallium a měď se tudíž uplatní u nízkomolekulárních látek, max. peptidů, zatímco zirkonium či jod jsou vhodné i pro značení fragmentů protilátek anebo protilátek.

V roce 2007 bylo v areálu Masarykova onkologického ústavu (MOÚ) uvedeno do provozu druhé produkční PET centrum ÚJV Řež, a.s. Ve spolupráci odborníků z MOÚ a ÚJV byla posléze vyvinuta a implementována metoda syntézy radiofarmaka [¹¹C]metionin, markeru proteosyntézy vhodného zejména pro vizualizaci mozkových nádorů. V současnosti je tato látka v probíhajícím klinickém hodnocení prováděném na Oddělení nukleární medicíny MOÚ. Výzkumná spolupráce se průběžně rozšiřuje i na další PET radiofarmaka. V souvislosti se spoluprací byl v roce 2009 publikován krátký review článků o možnostech metody PET [5]. V následujícím textu bude zhodnocen vývoj na poli PET radiofarmak z hlediska dostupnosti, zdokonalení syntézni instrumentace a dalších.

[¹¹C]-radiofarmaka

Uhlík-11 (¹¹C) má poločas přeměny 20 minut. Radiofarmaka značená ¹¹C jsou ve vědecké obci často ne zcela korektně chápána jako čistě výzkumná. K tomuto postoji nicméně existuje opodstatněný důvod – díky krátkému poločasu je jejich využití možné výlučně v takových zařízeních, která disponují jak výrobní, tak zobrazovací technikou víceméně na jednom místě – transportovatelnost takového radiofarmaka je v řádu jednotek kilometrů, tedy jednoho města. V zahraničí

umožňuje smysluplné využití [¹¹C]-radiofarmak poměrně časté uspořádání, kdy (většinou univerzitní) nemocnice vlastní také cyklotronové centrum, díky kterému mohou provádět in-house produkci a využívat radiofarmaka bez jeho nákladné registrace. Vzhledem k drasticky omezeným možnostem komercializace nemají komerční výrobci radiofarmak většinou ani zájem do jejich registrace investovat. Na poli dostupnosti [¹¹C]-radiofarmak proto žádné zásadní novinky v posledních pěti letech nevzešly, onkologické aplikace využívají [¹¹C]cholin [6–8] coby marker proliferace (stavební materiál pro nové biomembrány), který vykazuje v určitých směrech lepší vlastnosti než fluorovaný derivát cholinu, již zmíněný [¹¹C]metionin jako marker proteosyntézy [9,10], a konečně [¹¹C]acetát, marker oxidativního metabolismu s aplikacemi také v kardiologii [11–14]. Pravděpodobně nejpoužívanějším [¹¹C]-radiofarmakem je neonkologický marker [¹¹C]PIB, první radiofarmakum (a první *in vivo* metoda vůbec), kterým je možno vizualizovat β-amyloidové depozity v mozku a tím posuzovat stav pacientů s Alzheimerovou demencí [15,16].

[¹⁸F]-radiofarmaka

U radiofarmak značených fluorem-18 je situace podstatně jiná. Díky poločasu přeměny ¹⁸F, který činí 109 minut, je možno takováto radiofarmaka distribuovat i do vzdálenějších lokací, což podstatně zvyšuje jejich komerční uplatnění a rentabilitu nákladů investovaných do jejich vývoje, zavedení výroby a registrace. Mezi výhody fluorodeoxyglukózy mimo již uvedených chemických, biochemických a farmakokinetických vlastností patří také velice propracovaná a odladěná technologie syntézy, dosahující vysokého výtěžku a vysoké čistoty výsledného produktu. Toho bylo možno dosáhnout díky specializovaným, robustním syntézni modulům ušitým na míru právě této syntéze (obr. 1). Vývoj modulů specializovaných na FDG byl vzhledem k poptávce opět finančně snadno odůvodnitelný. U ostatních fluorovaných radiofarmak pak chybělo jednoznačné finanční incentívum pro zavedení do výroby a registraci (poptávka

bude vždy výrazně menší). Důvodů bylo několik – syntéza vyžadovala prakticky radiofarmakum od radiofarmaka více či méně složité modifikace komerčně dostupných modulů, což výrazně snižovalo jejich flexibilitu při úmyslu vyrábět více různých radiofarmak bez nutnosti pořizovat na každé další nákladný přístroj. Důsledkem toho pak mohly být problémy s režimem správné výrobní praxe (GMP) v případě úmyslu střídání více radiofarmak na jednom modulu, zejména díky nutnosti důkladného a náročného čištění za účelem zabránění kontaminaci mezi dvěma různými farmaky. Vyvinuté syntézy pak navíc často mívaly nízké výťažky (5–20 % oproti 50–60 % u FDG).

Situace se nicméně změnila s nástupem nové generace syntézních modulů pracujících na kazetovém či cartridgeovém způsobu. Moduly této generace využívají pouze nezbytné minimum součástí pevně usazených v těle modulu – pumpy, detektory, ovládání ventilů, pícky apod. Sama syntéza probíhá na víceméně jednorázové, vyjímatelné části modulu, většinou řešené plastovým rámem (kazetou), do které jsou vsazeny



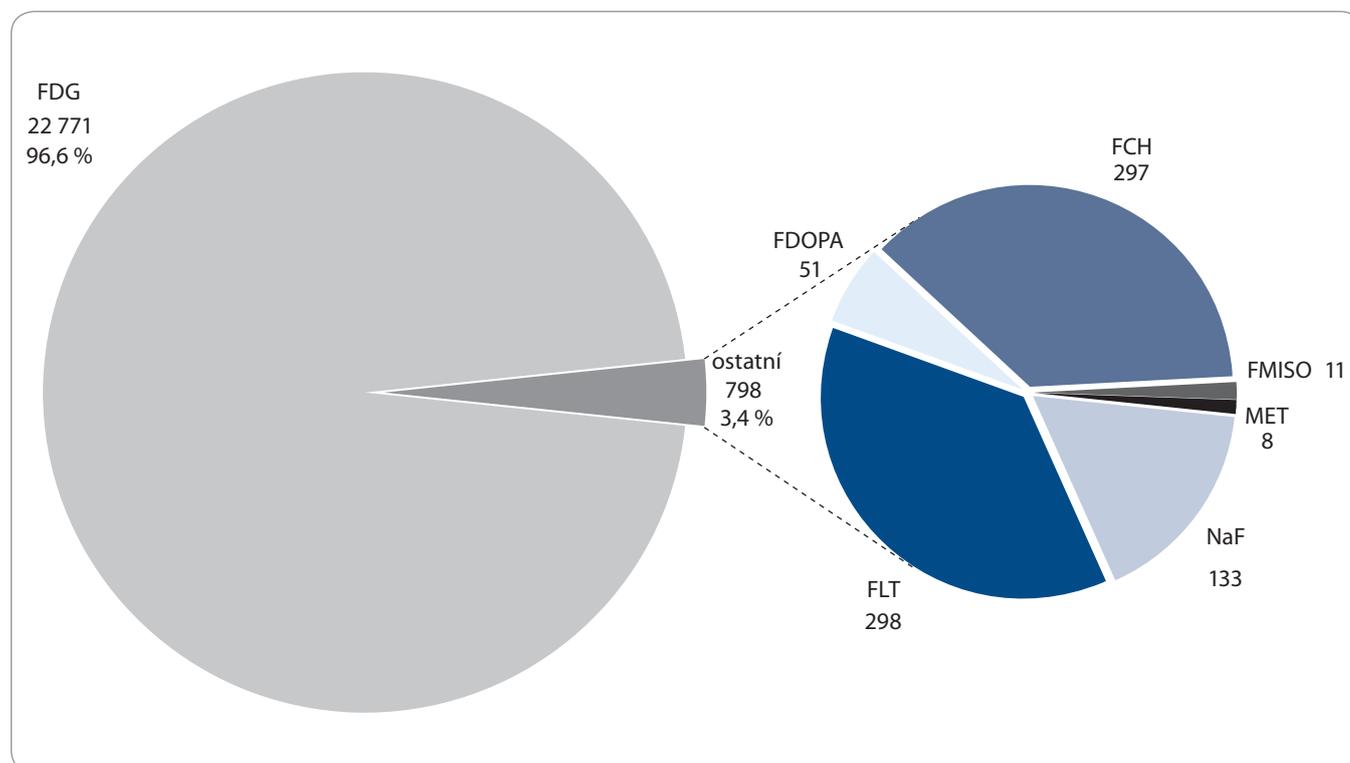
Obr. 1. GE Tracerlab FX-FDG, syntézní modul pro přípravu [¹⁸F]fluorodeoxyglukózy.

nádobky s reagentii, nutné spojovací kapiláry a reakční či sběrné nádobky. Modul takového uspořádání je při stejném či dokonce menším místě, které zaujímá, schopen vyrábět větší počet radiofarmak v závislosti na použité kazetě a spuštěném programu, je eliminována nutnost náročného čištění a tím mimo jiné usnadněno vyhovění požadavkům GMP. Výrobní místo vybavené modulem tohoto typu je lépe připraveno reagovat na měnící se poptávku. Jedním z prvních modulů tohoto typu byl TracerLab MX výrobce GE Healthcare, v současnosti



Obr. 2. Kazetový syntézní modul IBA Synthera (zdroj: <http://iba-industrial.com/synthera>).

moduly tohoto typu nabízí již několik výrobců – u GE je to např. další generace FASTLab, dále ModularLab-Pharm-Tracer výrobce Eckert & Ziegler, moduly Synthera výrobce IBA (obr. 2), moduly firmy Scintomics a další. Nástup těchto modulů byl významný faktor pro obecné



Obr. 3. Počty aplikací jednotlivých PET radiofarmak v ČR v roce 2013 (zdroj: doc. MUDr. Otakar Bělohávek, CSc., PET centrum, Nemocnice Na Homolce).

zvýšení dostupnosti ne-FDG fluorovaných radiofarmak.

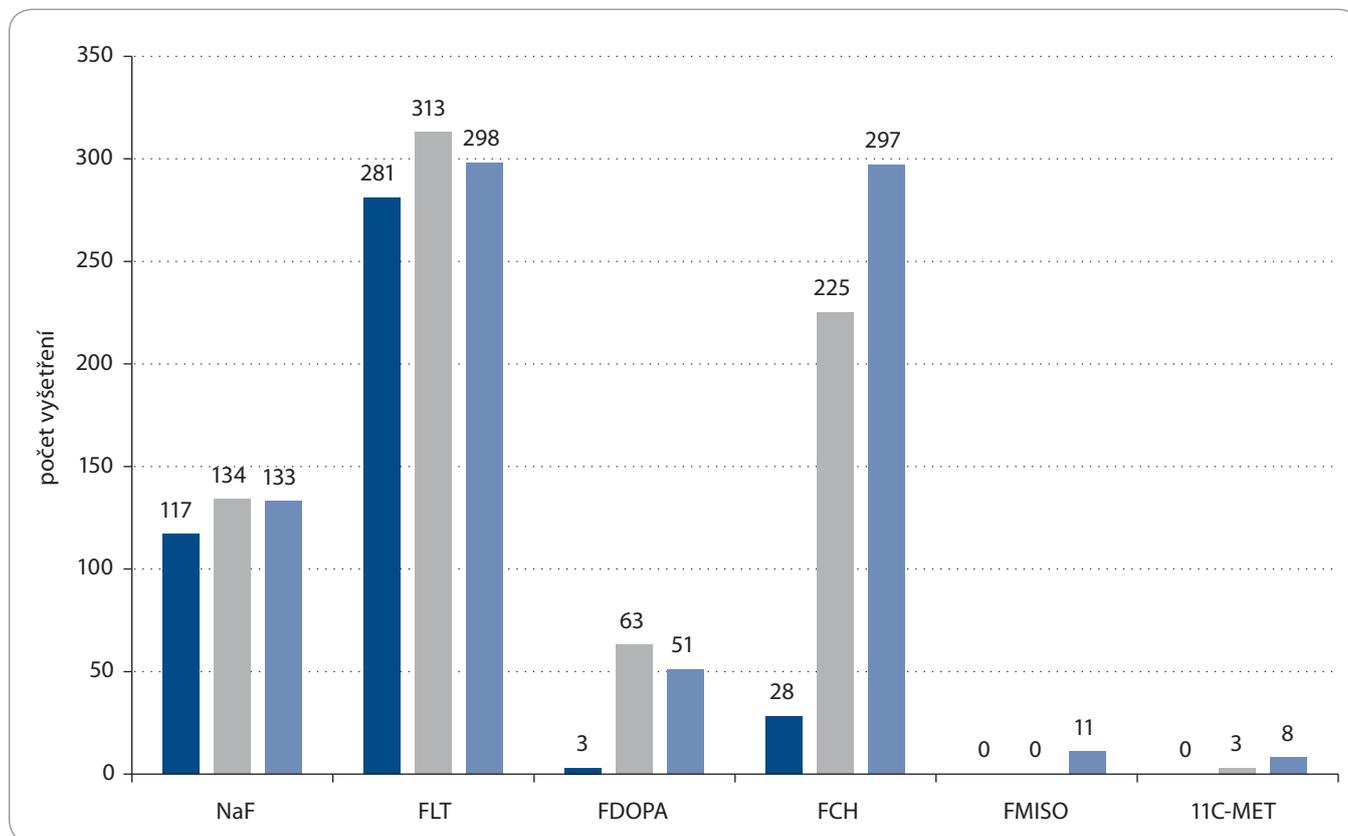
V roce 2009 byly hlavními používanými fluorovanými PET radiofarmaky mimo fluorodeoxyglukózu zejména proliferační marker [^{18}F]fluor-L-thymidin [17–28] a [^{18}F]fluorid sodný [29–35], druhý zvláště díky nástupu první techneciové krize, kdy nedostatek technecia způsobil sníženou dostupnost tradičního radiofarmaka pro vizualizaci skeletu (SPECT radiofarmakum [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-MDP). Následující roky zaznamenaly prudký vzestup zájmu o [^{18}F]fluorcholin, radiofarmakum určené primárně pro diagnostiku karcinomu prostaty prostřednictvím zvýšeného příjmu této látky, eliminující hlavní nevýhody [^{18}F]FDG pro toto použití – blízkost močového měchýře a malé rozměry cílového orgánu [36–39]. V tomto případě velmi napomohla syntéza vyvinutá na kazetovém systému GE TracerLab MX. Zastoupení PET vyšetření s pomocí jednotlivých radiofarmak v ČR v roce 2013 demonstruje obr. 3. V současnosti je fluorcholin hlavním PET ra-

diofarmakem pro diagnostiku karcinomu prostaty a počet vyšetření s tímto radiofarmakem se v okolních zemích mezi fluorovanými radiofarmaky zařadil na druhé nejvyšší místo ihned za FDG. Tento trend je dobře patrný i z obr. 4, porovnávacího počty aplikací PET radiofarmak jiných než FDG v ČR v letech 2011, 2012 a 2013. Jeho možnosti nejsou ovšem limitovány jen na karcinom prostaty, zprávy z nedávné doby naznačují potenciální další zajímavé aplikace [40,41]. Příklad kombinovaného vyšetření pomocí FDG a fluorcholinu ilustruje obr. 5.

Nové možnosti syntéz na kazetových modulech přispěly ke stabilizaci situace u fluor-L-thymidinu, zásadní vzestup zaznamenaly zejména marker hypoxie [^{18}F]fluormisonidazol (FMISO) [42–45] a [^{18}F]fluoretyltyrosin (FET), látka vhodná pro vizualizaci nádorů mozku. Posledně zmíněný fluoretyltyrosin je podobně jako [^{11}C]metionin příkladem radioaktivně značené aminokyseliny [46–48]. Aminokyseliny jsou díky zvýšenému

metabolismu tumorových buněk přijímány buňkami skrze energeticky nezávislý L-aminokyselinový transportní systém a posléze metabolizovány nebo inkorporovány do proteinů. Využitím umělých, tedy nepřírozených L-aminokyselin je možné dosáhnout situace, kdy není příjem následován relativně rychlou metabolizací a je tudíž dosaženo vysoké retence vhodné pro imaging. Jedním z produktů tohoto myšlenkového proudu je *anti*-1-amino-3-[^{18}F]fluorcyklobutan-1-karboxylová kyselina, zkracována jako [^{18}F]FACBC. Podobně jako fluoretyltyrosin vykazuje velmi zajímavé vlastnosti pro vizualizaci nádorů mozku, jeví se také velmi nadějně s ohledem na vizualizaci karcinomu prostaty, kde by mohla podle některých studií konkurovat fluorcholinu [49–51].

S návratem techneciové krize, která nastane v horizontu příštích několika let díky uzavření dvou reaktorů produkujících v současnosti kolem 70 % molybden-99, matečného nuklidu do techneciových generátorů, lze očeká-

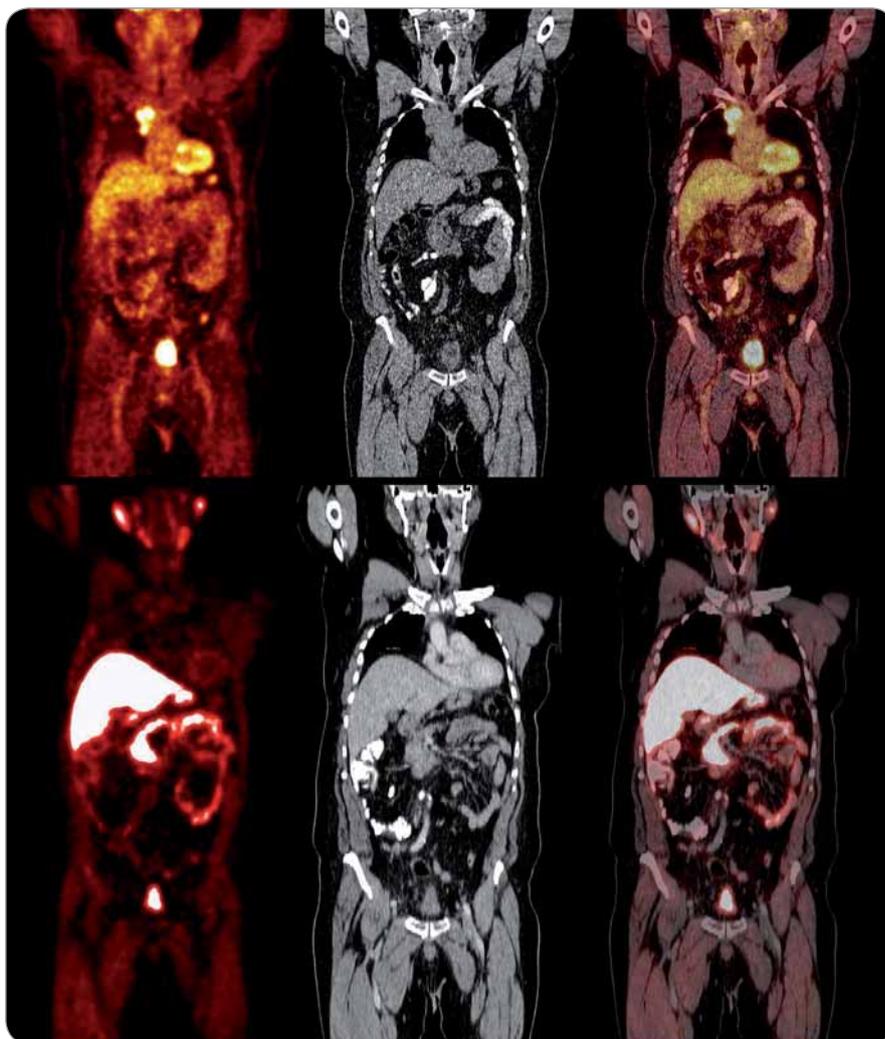


Obr. 4. Srovnání počtů aplikací jednotlivých PET radiofarmak vyjma FDG v ČR v letech 2011 (tmavě modrá), 2012 (šedá) a 2013 (světle modrá) (zdroj: doc. MUDr. Otakar Bělohávek, CSc., PET centrum, Nemocnice Na Homolce).

vat jistý nárůst zájmu o PET radiofarmaka schopná zastoupit vyšetření do této doby řešené [^{99m}Tc]-SPECT – zejména [^{18}F]fluorid sodný. Další z klasických fluorovaných radiofarmak, [^{18}F]fluor-L-DOPA [52], které je používáno v neurologii a onkologii, zaznamenává také v absolutních číslech určitý vzestup spojený se zlepšením dostupnosti, lze však očekávat opětovný pokles zájmu. V onkologii, kde se jeho aplikace týkala zejména neuroendokrinních tumorů, je důvodem rapidní nárůst dostupnosti alternativ založených z největší části na galliu-68.

Gallium-68

Nejvýraznějším novým prvkem na poli PET diagnostiky je neoddiskutovatelně gallium-68 (^{68}Ga). Tento radionuklid poprvé vešel do povědomí rodícího se oboru nukleární medicíny již v 60. letech 20. století, podruhé pak v letech 90. Tento nuklid se přeměňuje z 89 % β -plus přeměnou, maximální energie 1,92 MeV. Jeho poločas přeměny 68 minut je kompatibilní s farmakokinetikou relativně nízkomolekulárních RF. Opravdového rozvoje se ale aplikace ^{68}Ga dočkaly až v první dekádě třetího tisíciletí. Jednak se metoda PET/CT stala rutinně používanou zobrazovací modalitou, jednak se podařilo dosáhnout uspokojivé úrovně čistoty a produkce u hlavního zdroje ^{68}Ga – tedy germanium-galliových generátorů. Třetím podstatným faktorem byl přechod k účinnější radiochemii značení, kdy byly nahrazeny doposud používané „otevřené“ chelátory makrocyclickými strukturami (DOTA, NOTA) [53]. Ty odvádějí skvělou práci v odstínění galliového iontu proti sérovému proteinu transferinu, který má k němu vysokou afinitu. V kombinaci s vysokou termodynamickou stabilitou a zvýšenou efektivitou značení se otevřely široké klinické možnosti. Pravděpodobně nejvýznamnější aplikace je v tomto ohledu značení somatostatinových analogů – oktreotidů a oktreotátů – v PET období dlouho využívaného Octreoscanu (SPECT varianta vyšetření s ^{111}In) pro diagnostiku somatostatin-pozitivních neuroendokrinních nádorů [54–61]. Možnost pořízení germanium-galliového generátoru pak dovoluje využití na místech, kam



Obr. 5. Srovnání PET/CT vyšetření pomocí [^{18}F]FDG (horní řada) a [^{18}F]fluorocholinu (spodní řada) – zleva PET sken, CT sken a fúze – u stejného pacienta s duplicitou tumoru ledviny a karcinomu prostaty. Mediastinální lymfatické uzliny vykazují vysokou akumulaci FDG, nejsou však aktivní na vyšetření [^{18}F]fluorocholinu, s vysokou pravděpodobností tedy souvisí s nádorem ledviny a nikoliv s karcinomem prostaty.

by látka se svým poločasem přeměny 68 minut nebyla v dostatečné aktivitě transportovatelná.

Využití gallia pro rutinní PET diagnostiku musí ještě nicméně překonat několik překážek.

Přes všechna zdokonalení, kterých bylo v technologii Ge-Ga generátorů dosaženo, vyžaduje produkt stále poměrně náročné další zpracování – nejde tedy jako u klasické „molly cow“, tedy Mo-Tc generátoru o prostou eluci roztoku a smíchání s lyofilizovaným kitem. To je dáno zejména dvěma faktory – získaná forma gallia není přímo chemicky použitelná pro spojení s chelátorem a navázání na kýženou biomolekulu, a roztok

pořád obsahuje poměrně zásadní množství matečného germania-68 [62–65]. Nutnost dodatečného zpracování eluátu z generátoru může u koncového uživatele – nemocnice – zvyklého na jednoduché zacházení s Tc generátory znamenat zásadní problém i z hlediska potřebného personálu a vybavení nutného k dodržení správné praxe při produkci finální lékové formy. Mnoho výrobců syntézních modulů v uplynulých třech letech uvedlo nebo uvádí na trh moduly (či mikromoduly) specializované právě na úpravu galliového eluátu. Jistotou možností by tedy bylo zpracování gallia přímo u výrobce a dodávání již hotového radiofarmaka, viz dále.

Alternativa ke generátoru je výroba ^{68}Ga protonovým bombardováním (reakce $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$) na cyklotronu [66]. Reakce probíhá na zinkovém terči za využití klasického biomedicínského cyklotronu (potřebná energie cca 13,2 MeV). Výsledný produkt je možno separovat klasickou iontově-výměnnou kolonou. Kontaminace germaniem-68 je z hlediska technologie postupu prakticky vyloučena, naopak zinkové a měděné ionty lze odstranit vhodnou volbou sorbentu, čímž je eliminována nutnost post-produkčních úprav, které vyžaduje generátorový postup. U takto připraveného ^{68}Ga je ovšem poté logicky nutno řešit logistiku značení a vyšetření s ohledem na krátký poločas přeměny – tento přístup je potenciálně vhodný pro výrobní centra s vysokou okolní hustotou PET kamer, případně s vlastní kamerou.

Potenciální využití ^{68}Ga je nesporné a prakticky nezastupitelné zejména na poli nízkomolekulárních biomolekul, tedy oligopeptidů a proteinových fragmentů [67]. ^{68}Ga oktoretátové skeny jsou již nyní v okolních zemích prováděny ve srovnatelné míře jako skeny s radiofarmaky jinými než FDG, vyjma fluorocholinu. Jeho širšímu rozšíření zatím bránila suboptimální dostupnost spojená s výše zmíněnými problémy. Označitelých a využitelných markerů je nicméně velké množství, v současné době prováděné studie s PSMA (prostate-specific membrane antigen) [68–70] či bombesinem [71] (tumorový marker např. pro malobuněčný karcinom plic, neuroblastomy či nádory žaludku) označenými galliem jsou pouhými prvními příklady dynamicky se rozvíjejícího nového pole vysoce specifických PET radiofarmak.

Zirkonium-89

Vedle ^{68}Ga je vhodné se zmínit ještě o dalším z kovových iontových PET zářičů, a sice o zirkoniu-89 (^{89}Zr). Tento nuklid má ideální parametry ke značení monoklonálních protilátek a jejich následné vizualizaci. Poločas přeměny 78,4 hodin odpovídá biologickému poločasů protilátky a je dostatečný pro to, aby rozložení dosáhlo optimálního poměru mezi cílem a okolím. PET obraz navíc není rušen vedlejšími produkty přeměny jádra (23 % β^+ přeměny s doprovod-

ným γ zářením o 909 keV, které neinterferuje s 511 keV anihilačními fotony využívanými k detekci PET kamerou) – čímž se liší např. od pro podobné účely používaného jodu-124, jenž produkuje γ zářením výrazně bližší 511 keV. Zirkonium je navíc po internalizaci protilátky podrženo v buňce, čímž se opět liší např. od jodu-124.

^{89}Zr je produkováno na terči z přírodního yttria reakcemi $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ nebo $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$. Výhoda této metody spočívá zejména ve faktu, že přírodního yttria není nedostatek a terče jsou i díky tomu komerčně poměrně solidně dostupné. Produkce je možná na standardních biomedicínských cyklotronech (do 18 MeV). Průměrný výtěžek je 6–8 GBq ^{89}Zr za 4–6 hodin ozařování. Jelikož inaktivovaná aktivita pro jednoho pacienta je kolem pouhých 37–74 MBq značené protilátky, je takové množství dostačující pro studie zaměřené na imuno-PET aplikace.

Produkt po ozařování obsahuje radiochemické nečistoty. Jedná se zejména o yttrium-88, zirkonium-88 a matečně yttrium-89. Z tohoto důvodu je nutno výsledný produkt podrobit purifikaci, kde jsou tyto nečistoty odstraněny. Většinou se pro tyto účely používá afinitní chromatografie s následnou elucí kyseliny, která poskytuje dostatečně čistý roztok iontu Zr^{4+} dále využitelný pro značení protilátek [72,73]. Samotná vazba zirkonia na protilátku probíhá pomocí chelátorů schopných na jedné straně pevné koordinace iontu Zr zabraňujícímu jeho uvolnění, na druhé straně nedestruktivní vazby na protilátku samotnou. Původně bylo pro tyto účely využíváno „klasických“ chelátorů pro kovové radioaktivní ionty (EDTA, DTPA, DOTA). Specifická koordinační chemie zirkonia však iniciovala stále probíhající vývoj chelátorů lépe využitelných pro tento iont.

Již bylo uvedeno, že dlouhý poločas ^{89}Zr jej činí ideálním pro využití při protilátkových aplikacích PET a dovoluje jeho transport na poměrně dlouhé vzdálenosti, ať již v podobě přečištěného produktu určeného ke značení či ve formě hotové značené protilátky. Jeho schopnost vázat se prakticky na jakoukoli protilátku z něj dělá velmi účinný nástroj

k diagnostice a zejména pro určení potenciální citlivosti daného nádoru na zvolenou biologickou léčbu. Je doloženo poměrně solidní množství preklinických i klinických využití ^{89}Zr , kdy byla tímto nuklidem označena standardně používaná terapeutická protilátka a metoda PET využita k ověření cílení a následnému monitoringu léčby [74–80]. Lze konstatovat, že možnosti ^{89}Zr jsou v tomto ohledu limitovány pouze dostupností daných protilátek – a s ohledem na rozvoj na poli produkce protilátek a jejich zpřístupňování širšímu spektru medicínských zařízení je pravděpodobné, že se budou rozšiřovat. Největší komplikací, alespoň v ČR a okolních zemích, tak může být prozatímni absence zařízení s dostatečným záze- mím, které by splňovalo požadavky na zacházení jak s radioaktivním, tak s biologickým materiálem za dodržení veškerých platných předpisů, správné výrobní a správné laboratorní praxe.

Závěr

Uplynulých pět let přineslo na poli PET radiofarmak výrazné změny zvláště na poli syntézní techniky. Díky miniaturizaci a narůstající flexibilitě syntézních zařízení by mělo být pro daného výrobce snadnější produkovat více radiofarmak za snížené nutnosti investovat do většího počtu syntézních zařízení. Velký potenciál se nepochybně skrývá v ^{68}Ga . Zde bude velice záležet na vybudování případné distribuční sítě a vyřešení zpracování generátorového materiálu. Je tedy pouze otázkou, nakolik bude schopné na tyto nové možnosti reagovat samo zdravotnictví z hlediska kapacit PET vyšetření, možnosti jejich financování a případných úhrad.

Literatura

- Gallagher BM, Ansari A, Atkins H et al. Radiopharmaceuticals XXVII. 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose as a radiopharmaceutical for measuring regional myocardial glucose metabolism in vivo: tissue distribution and imaging studies in animals. *J Nucl Med* 1977; 18(10): 990–996.
- Schirrmeyer H, Kühn T, Guhlmann A et al. Fluorine-18 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose PET in the preoperative staging of breast cancer: Comparison with the standard staging procedures. *Eur J Nucl Med* 2001; 28(3): 351–358.
- Votrubova J, Belohlavek O, Jarskova M et al. The role of FDG-PET/CT in the detection of recurrent colorectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33(7): 779–784.

4. Chessin DB, Kiran RP, Akhurst T et al. The emerging role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the management of primary and recurrent rectal cancer. *J Am Coll Surg* 2005; 201(6): 948–956.
5. Adam J, Andres P, Bolčák K et al. Nová radiofarmaka a aplikace pozitronové emisní tomografie na Masarykově onkologickém ústavu v Brně. *Klin Onkol* 2009; 22(3): 94–97.
6. Ceci F, Castellucci P, Graziani T et al. 11C-Choline PET/CT detects the site of relapse in the majority of prostate cancer patients showing biochemical recurrence after EBRT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 41(5): 878–886. doi: 10.1007/s00259-013-2655-9.
7. Jereczek-Fossa BA, Rodari M, Bonora M et al. [11C]choline PET/CT impacts treatment decision making in patients with prostate cancer referred for radiotherapy. *Clin Genitourin Cancer* 2013; doi: 10.1016/j.clgc.2013.11.002.
8. Umbehr MH, Müntener M, Hany T et al. The role of 11C-choline and 18F-fluorocholine positron emission tomography (PET) and PET/CT in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2013; 64(1): 106–117. doi: 10.1016/j.eururo.2013.04.019.
9. Roelcke U, Radü EW, van Ammon K et al. Alteration of blood-brain-barrier in human brain-tumors: comparison of [F-18]fluorodeoxyglucose, [11C]methionine and Rb-82 using PET. *J Neurol Sci* 1995; 132(1): 20–27.
10. Hatakeyama T, Kawai I, Nishiyama Y et al. C-11-methionine (MET) and F-18-fluorothymidine (FLT) PET in patients with newly diagnosed glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(11): 2009–2017. doi: 10.1007/s00259-008-0847-5.
11. Grassi I, Nanni C, Allegri V et al. The clinical use of PET with (11)C-acetate. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 2(1): 33–47.
12. Larsson P, Arvidsson D, Björnstedt M et al. Adding 11C-acetate to 18F-FDG at PET examination has an incremental value in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Mol Imaging Radionucl Ther* 2012; 21(1): 6–12. doi: 10.4274/Mirt.87.
13. Mohsen B, Giorgio T, Rasoul ZS et al. Application of (11)C-acetate positron-emission tomography (PET) imaging in prostate cancer: systematic review and meta-analysis of the literature. *BJU Int* 2013; 112(8): 1062–1072. doi: 10.1111/bju.12279.
14. Orevi M, Klein M, Mishani E et al. 11C-acetate PET/CT in bladder urothelial carcinoma: intraindividual comparison with 11C-choline. *Clin Nucl Med* 2012; 37(4): e67–e72. doi: 10.1097/RLU.0b013e31824786e7.
15. Berti V, Pupi A, Mosconi L. PET/CT in diagnosis of dementia. *Ann NY Acad Sci* 2011; 1228: 81–92. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06015.x.
16. Rabinovici GD, Furst AJ, O'Neil JP et al. 11C-PIB PET imaging in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2007; 68(15): 1205–1212.
17. Been LB, Suurmeijer AJ, Cobben DC et al. [18F]FLT-PET in oncology: current status and opportunities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31(12): 1659–1672.
18. Shields AF, Grierson JR, Dohmen BM et al. Imaging proliferation in vivo with [F-18]FLT and positron emission tomography. *Nat Med* 1998; 4(11): 1334–1336.
19. Rasey JS, Grierson JR, Wiens LW et al. Uptake of labeled FLT correlates with thymidine kinase (TK1) activity in human tumor cells. *J Nucl Med* 2000; 41: 36–37.
20. Buck AK, Halter G, Schirrmeyer H et al. Imaging proliferation in lung tumors with PET: F-18-FLT versus F-18-FDG. *J Nucl Med* 2003; 44: 1426–1431.
21. Vesselle H, Grierson J, Muzi M et al. In vivo validation of 3'-deoxy-3'-[F-18]fluorothymidine ([F-18]FLT) as a proliferation imaging tracer in humans: correlation of [F-18]FLT uptake by positron emission tomography with Ki-67 immunohistochemistry and flow cytometry in human lung tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8(11): 3315–3323.
22. Shields AF, Lawhorn-Crews JM, Briston DA et al. Analysis and reproducibility of 3'-deoxy-3'-[F-18]fluorothymidine positron emission tomography imaging in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(14): 4463–4468. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5243.
23. Yap CS, Vranjesevic D, Schiepers C et al. A comparison between [F-18]fluorodeoxyglucose (FDG) and [F-18] 3'-deoxy-3'-fluorothymidine (FLT) uptake in solitary pulmonary nodules and lung cancer. *J Nucl Med* 2003; 44 (Suppl): 123.
24. Buck AK, Pitterle K, Schirrmeyer H et al. [18F]FLT positron emission tomography for imaging Non-Hodgkin's lymphoma and assessment of proliferative activity. *J Nucl Med* 2003; 44(2): 188–189.
25. Direcks WG, Berndsen SC, Proost N et al. [F-18]FDG and [F-18]FLT uptake in human breast cancer cells in relation to the effects of chemotherapy: an in vitro study. *Br J Cancer* 2008; 99(3): 481–487. doi: 10.1038/sj.bjc.6604523.
26. Linecker A, Kermer C, Sulzbacher I et al. Uptake of F-18-FLT and F-18-FDG in primary head and neck cancer correlates with survival. *Nuklearmedizin* 2008; 47(2): 80–85.
27. Cobben DC, van der Laan BF, Hoekstra HJ et al. Detection of mammary, laryngeal and soft tissue tumors with FLT-PET. *J Nucl Med* 2002; 43 (Suppl): 278.
28. Francis DL, Visvikis D, Costa DC et al. Potential impact of [F-18]3'-deoxy-3'-fluorothymidine versus [F-18]fluoro-2-deoxy-glucose in positron emission tomography for colorectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30(7): 988–994.
29. Schirrmeyer H, Guhlmann A, Elsker K et al. Sensitivity in detecting osseous lesions depends on anatomic localization: planar bone scintigraphy versus 18F PET. *J Nucl Med* 1999; 40(40): 1623–1629.
30. Schirrmeyer H, Guhlmann A, Kotzerke J et al. Early detection and accurate description of extent of metastatic bone disease in breast cancer with fluoride ion and positron emission tomography. *J Clin Oncol* 1999; 17(8): 2381–2389.
31. Petrén-Mallmin M, Andréasson I, Ljunggren O et al. Skeletal metastases from breast cancer: uptake of 18F-fluoride measured with PET in correlation with CT. *Skeletal Radiol* 1998; 27(2): 72–76.
32. Grant FD, Fahey FH, Packard AB et al. Skeletal PET with 18F-fluoride: applying new technology to an old tracer. *J Nucl Med* 2008; 49(1): 68–78.
33. Hetzel M, Arslanemir C, König HH et al. F-18 NaF PET for detection of bone metastases in lung cancer: accuracy, cost-effectiveness, and impact on patient management. *J Bone Miner Res* 2003; 18(12): 2206–2214.
34. Even-Sapir E, Metser U, Flusser G et al. Assessment of malignant skeletal disease: initial experience with 18F-fluoride PET/CT and comparison between 18F-fluoride PET and 18F-fluoride PET/CT. *J Nucl Med* 2004; 45(2): 272–278.
35. Even-Sapir E, Metser U, Mishani E et al. The detection of bone metastases in patients with high-risk prostate cancer: 99mTc-MDP Planar bone scintigraphy, single- and multi-field-of-view SPECT, 18F-fluoride PET and 18F-fluoride PET/CT. *J Nucl Med* 2006; 47(2): 287–297.
36. Bauman G, Belhocine T, Kovacs M et al. 18F-fluorocholine for prostate cancer imaging: a systematic review of the literature. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2012; 15(1): 45–55.
37. Soyka JD, Muster MA, Schmid DT et al. Clinical impact of 18F-choline PET/CT in patients with recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39(6): 936–943. doi: 10.1007/s00259-012-2083-2.
38. Kwee SA, Coel MN, Lim J. Detection of recurrent prostate cancer with 18F-fluorocholine PET/CT in relation to PSA level at the time of imaging. *Ann Nucl Med* 2012; 26(6): 501–507. doi: 10.1007/s12149-012-0601-8.
39. Fabbri C, Galassi R, Moretti A et al. Radiation dosimetry of 18F-fluorocholine PET/CT studies in prostate cancer patients. *Phys Med* 2014; 30(3): 346–351. doi: 10.1016/j.ejmp.2013.10.007.
40. Quak E, Lheureux S, Reznik Y et al. F18-choline, a novel PET tracer for parathyroid adenoma? *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(8): 3111–3112. doi: 10.1210/jc.2013-2084.
41. Bieze M, Klumpen HJ, Verheij J et al. Diagnostic accuracy of 18F-methyl-choline PET/CT for intra- and extrahepatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014; 59(3): 996–1006. doi: 10.1002/hep.26781.
42. Cheng J, Lei L, Xu J et al. 18F-fluoromisonidazole PET/CT: a potential tool for predicting primary endocrine therapy resistance in breast cancer. *J Nucl Med* 2013; 54(3): 333–340. doi: 10.2967/jnumed.112.111963.
43. Okamoto S, Shiga T, Yasuda K et al. High reproducibility of tumor hypoxia evaluated by 18F-fluoromisonidazole PET for head and neck cancer. *J Nucl Med* 2013; 54(2): 201–207. doi: 10.2967/jnumed.112.109330.
44. Henriques de Figueiredo B, Merlin T, de Clermont-Gallerande H et al. Potential of [18F]-fluoromisonidazole positron-emission tomography for radiotherapy planning in head and neck squamous cell carcinomas. *Strahlenther Onkol* 2013; 189(12): 1015–1019. doi: 10.1007/s00066-013-0454-7.
45. Kobayashi H, Hirata K, Yamaguchi S et al. Usefulness of FMISO-PET for Glioma Analysis. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2013; 53(11): 773–778.
46. Götz I, Grosu AL. [(18)F]FET-PET imaging for treatment and response monitoring of radiation therapy in malignant glioma patients – a review. *Front Oncol* 2013; 3: 104. doi: 10.3389/fonc.2013.00104.
47. Crippa F, Alessi A, Serafini GL. PET with radiolabeled amino acid. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 56(2): 151–162.
48. Nataf V, Kerrou K, Balogova S et al. Fluoroethylthiosine 18F PET in the detection of brain tumours. *Bull Cancer* 2010; 97(5): 495–506. doi: 10.1684/bdc.2010.1078.
49. Schuster DM, Taleghani PA, Nieh PT et al. Characterization of primary prostate carcinoma by anti-1-amino-2-[(18)F]-fluorocyclobutane-1-carboxylic acid (anti-3-[(18)F] FACBC) uptake. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 3(1): 85–96.
50. Schiavina R, Brunocilla E, Martorana G. The new promise of FACBC position emission tomography/computed tomography in the localization of disease relapse after radical treatment for prostate cancer: are we turning to the right radiotracer? *Eur Urol* 2014; 65(1): 255–256. doi: 10.1016/j.eururo.2013.08.053.
51. Ono M, Oka S, Okudaira H et al. Comparative evaluation of transport mechanisms of trans-1-amino-3-[18F] fluorocyclobutanecarboxylic acid and L-[methyl-¹¹C]methionine in human glioma cell lines. *Brain Res* 2013; 1535: 24–37. doi: 10.1016/j.brainres.2013.08.037.
52. Imperiale A, Rust E, Gabriel S et al. 18F-fluorodihydroxyphenylalanine PET/CT in patients with neuroendocrine tumors of unknown origin: relation to tumor origin and differentiation. *J Nucl Med* 2014; 55(3): 367–372. doi: 10.2967/jnumed.113.126896.
53. Breeman WA, De Jong M, De Blois E et al. Radiolabeling DOTA-peptides with 68Ga. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32(4): 478–485.
54. von Falck C, Boerner AR, Galanski M et al. Neuroendocrine tumour of the mediastinum: fusion of 18F-FDG and 68Ga-DOTATOC PET/CT data sets demonstrates different degrees of differentiation. *Eur J Med Mol Imaging* 2007; 34(5): 812.
55. Maeke HR, Hofman M, Haberkorn U. 68Ga-labeled peptides in tumor imaging. *Nucl Med* 2005; 46 (S1): 172S–178S.
56. Sadeghi M, Kakavand T, Rajabifar S et al. Cyclotron production of 68Ga via proton-induced reaction on 68Zn target. *Nukleonika* 2009; 54(1): 25–28.
57. Meyer GJ, Maecke H, Schuhmacher J et al. 68Ga-labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31(8): 1097–1104.
58. Ocak M, Antretter M, Knopp R et al. Full automation of 68Ga labelling of DOTA-peptides including cation ex-

change prepurification. *Appl Radiat Isot* 2010; 68(2): 297–302. doi: 10.1016/j.apradiso.2009.10.006.

59. Roesch F, Riss PJ. The renaissance of the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator initiates new developments in ^{68}Ga radiopharmaceutical chemistry. *Curr Top Med Chem* 2010; 10(16): 1633–1668.
60. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP et al. Processing of generator-produced Ga-68 for medical application. *J Nucl Med* 2007; 48(10): 1741–1748.
61. Afshar-Oromieh A, Haberkorn U, Hadaschik B et al. PET/MRI with a ^{68}Ga -PSMA ligand for the detection of prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 40(10): 1629–1630. doi: 10.1007/s00259-013-2489-5.
62. Buchmann I, Henze M, Engelbrecht S et al. Comparison of ^{68}Ga -DOTATOC PET and ^{111}In -DTPAOC (octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34(10): 1617–1626.
63. Di Pierro D, Rizzello A, Cicoria G et al. Radiolabelling, quality control and radiochemical purity assessment of the octreotide analogue ^{68}Ga DOTA NOC. *Appl Radiat Isot* 2008; 66(8): 1091–1096. doi: 10.1016/j.apradiso.2007.12.001.
64. Decristoforo C, Knopp R, Von Guggenberg E et al. A fully automated synthesis for the preparation of ^{68}Ga -labelled peptides. *Nucl Med Commun* 2007; 28(11): 870–875.
65. Kowalski J, Henze M, Schuhmacher J et al. Evaluation of positron emission tomography imaging using ^{68}Ga -DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotide in comparison to ^{111}In -DTPAOC SPECT. First results in patients with neuroendocrine tumors. *Mol Imaging Biol* 2003; 5(1): 42–48.
66. Boschi S, Malizia C, Lodi F. Overview and perspectives on automation strategies in ^{68}Ga radiopharmaceutical preparations. *Recent Results Cancer Res* 2013; 194: 17–31. doi: 10.1007/978-3-642-27994-2_2.
67. Schreiter NF, Brenner W, Nogami M et al. Cost comparison of ^{111}In -DTPA-octreotide scintigraphy and ^{68}Ga -DOTATOC PET/CT for staging enteropancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39(1): 72–82. doi: 10.1007/s00259-011-1935-5.
68. Afshar-Oromieh A, Malcher A, Eder M et al. PET imaging with a ^{68}Ga gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 40(4): 486–495. doi: 10.1007/s00259-012-2298-2.
69. Afshar-Oromieh A, Haberkorn U, Eder M et al. ^{68}Ga Gallium-labelled PSMA ligand as superior PET tracer for the diagnosis of prostate cancer: comparison with ^{18}F -FECH. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39(6): 1085–1086. doi: 10.1007/s00259-012-2069-0.
70. Varshney R, Hazari PP, Fernandez P et al. ^{68}Ga -labelled bombesin analogs for receptor-mediated imaging. *Recent Results Cancer Res* 2013; 194: 221–256. doi: 10.1007/978-3-642-27994-2_12.
71. Dejesus OT, Nickles RJ. Production and purification of ^{89}Zr , a potential PET antibody label. *Int J Radiat Appl Instrum [A]* 1990; 41: 789–790.
72. Zweit J, Downey S, Sharma HL. Production of no-carrier-added zirconium-89 for positron emission tomography. *Int J Radiat Appl Instrum [A]* 1991; 42: 199–201.
73. Tinianow JN, Gill HS, Ogasawara A et al. Site-specifically ^{89}Zr -labeled monoclonal antibodies for ImmunoPET. *Nucl Med Biol* 2010; 37(3): 289–297. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2009.11.010.
74. Perk LR, Visser GW, Vosjan MJ et al. ^{89}Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals ^{90}Y and ^{177}Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med* 2005; 46(11): 1898–1906.
75. Vugts DJ, Visser GW, van Dongen GA. ^{89}Zr -PET radiochemistry in the development and application of therapeutic monoclonal antibodies and other biologicals. *Curr Top Med Chem* 2013; 13(4): 446–457.
76. Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG et al. Biodistribution of ^{89}Zr -trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 87(5): 586–592. doi: 10.1038/clpt.2010.12.
77. Gaykema SB, Brouwers AH, Hovenga S et al. Zirconium-89-trastuzumab positron emission tomography as a tool to solve a clinical dilemma in a patient with breast cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(6): e74–e75. doi: 10.1200/JCO.2011.38.0204.
78. Nagengast WB, de Korte MA, Oude Munnink TH et al. ^{89}Zr -bevacizumab PET of early antiangiogenic tumor response to treatment with HSP90 inhibitor NVP-AUY922. *J Nucl Med* 2010; 51(5): 761–767. doi: 10.2967/jnumed.109.071043.
79. Hoeben BA, Kaanders JH, Franssen GM et al. PET of hypoxia with ^{89}Zr -labeled cG250-F(ab')₂ in head and neck tumors. *J Nucl Med* 2010; 51(7): 1076–1083. doi: 10.2967/jnumed.109.073189.

„Techneciová krize“ – příčiny, možná řešení a dopad na diagnostiku planární scintigrafii a SPECT

„Technetium Crisis“ – Causes, Possible Solutions and Consequences for Planar Scintigraphy and SPECT Diagnostics

Adam J.^{1,2}, Kadeřávek J.², Kužel F.², Vašina J.³, Řehák Z.^{1,3}

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² ÚJV Řež, a. s., Husinec-Řež, Česká republika

³ Oddělení nukleární medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Nukleární medicína je důležitý obor moderní medicíny, zejména díky své roli v *in vivo* zobrazování důležitých dějů a procesů v lidském organismu. Drtivou většinu vyšetření nukleární medicíny tvoří planární scintigrafie a jednofotonová emisní tomografie (SPECT), jejímž základem je již několik desítek let značení nuklidem metastabilního technecia (^{99m}Tc), využívaným v kombinaci s nespočtem ligandů pro různé účely. Oddělení nukleární medicíny pracují s komerčně dostupnými molybdeno-techneciovými generátory, ze kterých je možno dle potřeby eluovat nuklid a připravit radiofarmakum. Matečný nuklid, molybden-99 (⁹⁹Mo), je připravován na pouhých několika místech na světě. Produkční místa jsou ovšem vesměs přestárlé výzkumné reaktory a souběžný výpadek dvou z nich v roce 2009 způsobil kritický celosvětový nedostatek ^{99m}Tc. Neodvratné uzavření části produkčních kapacit v druhé dekádě 21. století bude znamenat druhou a tentokrát trvalou „techneciovou krizi“. V článku informujeme o historii, současnosti, potenciální budoucnosti a možných řešeních situace s ohledem na diagnostiku SPECT.

Klíčová slova

nukleární lékařství – tomografie emisní, počítačová, jednofotonová – radiofarmaka – technecium – techneciová krize

Summary

Nuclear medicine is an important field of nuclear medicine, especially thanks to its role in *in vivo* imaging of important processes in human organism. An overwhelming majority of nuclear medicine examinations comprises of planar scintigraphy and single photon emission computed tomography, for decades relying on the labeling by metastable technetium nuclide (^{99m}Tc), used with a great diversity of ligands for various applications. Nuclear medicine departments utilize commercially available molybdenum-technetium generators, being able to elute the nuclide at any time and prepare the radiopharmaceutical. The mother nuclide, molybdenum-99 (⁹⁹Mo), is produced in just a handful of places around the world. The production places are without exception research nuclear reactors working far past their life expectancy. A concurrent temporary shutdown of two of them in the year 2009 caused a critical worldwide shortage of ^{99m}Tc. An unavoidable permanent shutdown of part of these capacities in the second decade of the 21st century will cause the second, and this time rather permanent “technetium crisis”. The article focuses on history, present, potential future and possible solutions in regard to SPECT diagnostics.

Key words

nuclear medicine – tomography, emission-computed, single-photon – radiopharmaceuticals – technetium – technetium crisis

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE “uniform requirements” for biomedical papers.



Ing. et Ing. Jan Adam, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: adam@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 11. 1. 2014

Přijato/Accepted: 3. 4. 2014

Úvod

Techneций bylo objeveno v roce 1937 jako vůbec první uměle připravený prvek, odtud i jeho název. Stalo se tak na Kalifornské univerzitě v Berkeley. Již o rok později pak Emilio Segré a Glenn T. Seaborg připravili izotop metastabilního technecia-99m prostřednictvím bombardování přírodního molybdenu deuteronovým paprskem [1]. O tři roky později popsal Emilio Segré společně s Chien-Shiung Wuem analýzu štěpných produktů uranu-235, které obsahovaly molybden-99 (^{99}Mo) [2]. I zde objevili přítomnost prvku s protonovým číslem 43 s 6hodinovým poločasem rozpadu. Tomuto izotopu se následně dostalo označení technecium-99m (^{99m}Tc).

Izotop ^{99m}Tc přesto zůstával vědeckou kuriozitou až do 50. let minulého století, kdy začal být poprvé rozeznáván jeho potenciál pro medicínu. Vědci z Brookhavenské národní laboratoře, kteří pracovali na projektu optimalizace eluce a purifikace jodu-132 z matečného teluru-132 připravovaného na místním reaktoru objevili ve svém materiálu sto-

pové množství kontaminantu, jenž se ukázal být právě ^{99m}Tc pocházející z přitomného ^{99}Mo . Jelikož chemie molybden-techneciového páru byla velmi podobná zkoumanému teluro-jodovému, byl v roce 1958 na základě těchto znalostí zkonstruován první „techneciový generátor“ [3]. V 60. letech začala myšlenka využití technecia pro medicínské účely získávat stále více příznivců.

První studie v USA byla zveřejněna v roce 1963 [4]. Injektovaný ^{99m}Mo se koncentroval v játrech, kde vytvořil v podstatě interní generátor. Játra bylo možno vizualizovat pomocí gama skeneru. V následujících třech letech demonstrovaly užitečnost ^{99m}Tc coby diagnostického nástroje či radiotraceru početné další studie [5–10]. Společně s rapidním rozvojem planárních gamakamer a prvních SPECT gamakamer tak byl položen základní kámen nukleární medicíny – oboru, který zejména v diagnostické aplikaci čekal v budoucnu strmý růst. Technecium se stalo nepostradatelným radiofarmakem pro 2D scintigrafii a později pro SPECT – jednofotonovou emisní

tomografii, zvláště kombinovanou s výpočetní tomografií. V kombinaci s různě zvolenými ligandy-nosiči dokázalo technecium vizualizovat velké spektrum dějů a orgánů. Nejdůležitější aplikace ^{99m}Tc v nukleární medicíně shrnuje tab. 1.

Techneций mělo všechny vlastnosti, které si lékař mohl přát. V reaktoru byl neutrony ostřelován uranový terč za produkce velkého počtu dceřiných izotopů včetně 6% ^{99}Mo . Jeho poločas rozpadu, 66 hodin, stačil právě tak na jeho extrakci z reaktoru, separaci od zbytku izotopů a uzavření do generátorů, jež byly rozváženy do nemocnic po celém světě. Jak se molybden postupně rozkládal, produkoval stabilní zásobu ^{99m}Tc , která se dala z generátoru kdykoli eluovat či – jak se v medicínské obci ustálilo říkat – generátor „podojit“. Díky vynikajícím komplexotvorným vlastnostem technecia pak bylo možno s eluovaným roztokem technecianu připravovat radiofarmaka na místě, většinou s použitím lyofilizovaných, práškových kitů obsahujících příslušné ligandy plus pomocné látky [11,12]. Generátory byly snadno

Tab. 1. Příklady využívaných SPECT radiofarmak na bázi ^{99m}Tc .

Zkratka	Chemický název	Klinické využití pro zobrazování
$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$	^{99m}Tc -technecistan sodný	krevní perfuzemorfologie a funkce štítné žlázy
^{99m}Tc -MDP a další fosfonáty	^{99m}Tc -metylendifosfonát	vyšetření skeletu – metastázy, kostní poruchy, degenerativní a zánětlivé změny
^{99m}Tc -DTPA	^{99m}Tc -dietylentetraaminpentaacetát	ledviny (glomerulární filtrace), krevní perfuze plic (ventilační scintigrafie – aerosol)
^{99m}Tc -MAG3	^{99m}Tc -merkaptocetyltriglycin	ledviny (dynamická scintigrafie)
^{99m}Tc -DMSA	^{99m}Tc -meso-dimerkapto-jantarová kyselina	ledviny (statická scintigrafie), játra, štítná žláza
^{99m}Tc -MAA	^{99m}Tc -albuminové makroagregáty	perfuze plic
^{99m}Tc -koloidy	^{99m}Tc , koloidní suspenze s dalšími látkami	játra, slezina, lymfoscintigrafie sentinelových uzlin
^{99m}Tc -HIDA	^{99m}Tc -N-(2,6-dimetylfenylkarbamoylmetyl)iminodiacetát	funkce jater a žlučových cest
^{99m}Tc -sestamibi	^{99m}Tc -hexakis(2-metoxisobutylisonitril)	perfuze myokardu, mammoscintigrafie, vyšetření štítné žlázy a příštítných tělísek
^{99m}Tc -tetrafosmin	^{99m}Tc -1,2-bis(bis(2-ethoxyetyl)fosfino)etan	perfuze myokardu
^{99m}Tc -HMPAO	^{99m}Tc -d,l-hexametylpropylenaminoxim	mozek, buněčná a mozková perfuze, leukocyty a zánětlivé procesy, bioenergetika tkáně

dostupné, technecium, vztaženo na jednotku aktivity, výrazně levnější než jiná radiofarmaka a zobrazovací instrumentace, scintigrafy nebo SPECT či SPECT/CT skenery taktéž levnější než např. PET alternativa. Mnoho diagnostických metod bylo nahrazeno techneciovými skeny a lékaři po celém světě si nedokázali představit provoz bez tohoto izotopu. Pak udeřila první techneciová krize.

První techneciová krize

V roce 2009 čítal celkový počet vyšetření na světě provedených s pomocí ^{99m}Tc zhruba 30 milionů, přičemž jen USA se na tomto výsledku podílely cca 20 miliony vyšetřeními. Není se proto čemu divit, že situace, kdy prakticky „přes noc“ došlo k poklesu objemu dodávek generátorového materiálu o 30–70 % (v závislosti na místě a času), zasáhla medicínskou scénu velice tvrdě [13,14]. Jak k takové situaci mohlo dojít? Důvod je prostý. Z přibližně 250 výzkumných reaktorů fungujících po celém světě bylo schopno radionuklidy produkovat v průmyslovém měřítku pouze pět – reaktor National Research Universal (NRU) v Chalk River, Kanada, High Flux Reactor (HFR) v Pettenu, Nizozemí, SAFARI-1 v Pelindabě, Jižní Afrika, BR2 v Mol, Belgie a OSIRIS v Saclay, Francie. Zpracování ozářeného materiálu bylo prováděno v pouhých čtyřech centrech (Belgie, Kanada, Nizozemí a Jižní Afrika).

Všechny zmíněné reaktory měly mnohé společného. ^{99}Mo zde byl vyráběn ozařováním terčů z obohaceného uranu. Vesměs se jednalo o výzkumné reaktory, které byly v provozu více než 40 let. S tím se pojila nutnost pravidelných odstávek k údržbě, jež musely být mezi jednotlivými reaktory precizně synchronizovány. V půli roku 2008 došlo k plánované odstávce reaktoru HFR v Pettenu, v této době zastávajícího přibližně 33 % světové produkce. Následovaly plánované odstávky reaktorů NRU, BR2 a OSIRIS. Díky objevené korozi a netěsnostem nebyl reaktor HFR znovu včas spuštěn. V jednu chvíli tak fungoval jediný produkční reaktor na celé planetě – jihoafrické SAFARI-1. Nezávisle na tom muselo být kvůli úniku radioaktivního jodu uzavřeno belgické zpracovatelské centrum IRE. Reaktor HFR byl uveden znovu do provozu v únoru 2009, vzápětí ovšem vysadil kanadský

reaktor NRU zajišťující 40 % světové produkce, a ačkoliv byl poměrně rychle uveden do provozu, únik těžké vody si vyžádal další odstavení v květnu 2009 trvajících 15 měsíců. Opravy HFR způsobily další měsíc odstávky v roce 2009 a šest jiných v roce 2010 [15]. V krizové situaci bylo nutno prověřit možnosti ostatních reaktorů a nasadit alternativní logistické řetězce – zapojily se např. OPAL v Austrálii, FRM-II v Německu, MARIA v Polsku či reaktor LVR-15 v Řeži u Prahy (s nutností transportu materiálu ke zpracování do Nizozemí anebo Belgie). Až do restartování obou reaktorů v srpnu, resp. září 2010 se tak celý svět musel ve značné míře obejít bez dostatečného množství ^{99m}Tc . Díky této krizi muselo být statisícům pacientů odepřeno vyšetření pomocí tohoto radioizotopu. Některá z vyšetření mohla být nahrazena alternativními metodami, např. PET, avšak za mnohem vyšší cenu, jiná za cenu použití méně etablovaných radioizotopů. Většina vyšetření však musela být odložena či zrušena a není vyloučeno, že pro některé pacienty mohlo být takové zdržení klíčové až fatální. Dle tehdejších slov amerických odborníků se „nukleární diagnostika v USA propadla prakticky zpět do 60. let minulého století“.

Poučení z krize

Na sklonku roku 2010 byla tedy první techneciová krize zažehnána. Zůstalo po ní ale mnoho otázek, z nichž primární je – bude se krize opakovat? Odpověď je jasná. Velmi pravděpodobně, a to brzy. Hlavní důvody jsou následující:

1. Zastaralost produkčních reaktorů

Jak již bylo uvedeno, hlavní pětice reaktorů výrazně přesluhuje. Reaktor NRU v Chalk River, Ontario, Kanada, je v roce 2013 v provozu již 56 let, HFR v Pettenu 52 let, francouzský OSIRIS v Saclay 47 let. Chvilí, kdy nebude dále možno tyto reaktory udržovat v provozu, se nezdářitelně blíží. Plánované uzavření NRU se mělo odehrát v roce 2005 a pouze díky intervenci kanadské vlády, která přehlasovala doporučení bezpečnostních inspektorů, se tak nestalo. Jak HFR, tak OSIRIS by měly být definitivně uzavřeny v letech 2014–2016. Kanadská vláda nicméně oznámila plán na definitivní uzavření reaktoru NRU v říjnu 2016.

2. Ekonomická neudržitelost spolehlivosti dodávek

Produkční reaktory vesměs sloužily ke státem plně financovanému výzkumu. ^{99}Mo byl vedlejším produktem normální činnosti reaktoru, nic tedy nebránilo nasazení iracionálně nízké ceny pokrývající prakticky jen cenu ozářeného materiálu, která nerefletovala ani pozdější nárůst významu produkovaného materiálu. Stát se tak ocitl na počátku i konci logistického řetězce (produkce ^{99}Mo a vyšetření ^{99m}Tc) s odpovídající motivací udržet ceny v celém řetězci nereálně nízké. Tyto praktiky ve svém důsledku nejen nepokryly cenu provozování a údržby reaktoru, ale též účinně bránily budování nových infrastruktur – uměle nízká cena již v základu odradila jakékoli komerční subjekty od snah budovat a provozovat alternativní zdroje.

3. Nucený přechod na nízkoobohacené uranové terče

Veškerá zatím zmíněná produkce ^{99}Mo využívala původní technologie vyvinuté v 60. letech 20. století – tedy ozařování vysokoobohacených uranových terčů (obsahujících více než 20 % uranu-235 – přírodní uran obsahuje méně než 1 %). Nicméně vysokoobohacený uran (HEU) je materiál pro výrobu jaderných zbraní. USA, jediný dodavatel HEU produkčním reaktorům, v současnosti zastavuje veškerý export HEU s plánem totálního zrušení v roce 2020, a to jako součást strategie boje proti nukleárnímu zbrojení [16]. Belgie, Nizozemí a Francie se k této iniciativě připojily také a souhlasily s přechodem na nízkoobohacené uranové terče do konce roku 2015. Co to bude znamenat pro produkci? Nižší výtěžky ^{99}Mo , vyšší množství odpadu – oba faktory přispějí k dalšímu navýšení ceny ^{99}Mo [17]. Situaci lze tedy shrnout následovně – cena $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ je iracionálně nízká, logistické řetězce křehké, produkční kapacity nedostatečné a zastaralé – situace neudržitelná, a to již v krátkodobém horizontu.

Možnosti řešení

Existuje v této situaci řešení? Na to se v uplynulých letech snažilo najít odpověď mnoho lékařů, specialistů či odborných komisí včetně IAEA (International

Atomic Energy Association – Mezinárodní agentura pro atomovou energii) nebo OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj). Odpověď na tuto otázku? Ano, ale v žádném případě ne takové, které navrátí vše do situace před rokem 2008.

1. Vybudování nových reaktorů či upgrade stávajících

Do této kategorie spadají snahy udržet současné reaktory ještě nějakou dobu v chodu či vybudovat jim adekvátní náhrady. První projekt tohoto typu byl kanadský Multipurpose Applied Physics Lattice Experiment (MAPLE), dva reaktory dedikované přímo výrobě izotopů, přičemž každý ze dvou plánovaných měl zajistit produkci odpovídající 100 % světové potřeby ^{99}Mo . Reaktory MAPLE I a MAPLE II byly vybudovány v Chalk River (lokace NRU) v roce 2000, nicméně v průběhu jejich testování vyšla na povrch zásadní designová pochybení vedoucí k závažným bezpečnostním nedostatkům, které modelové studie neodhalily. Nejvýraznějším problémem byl pozitivní koeficient reaktivity, potenciálně hrozící nekontrolovatelným rozvojem řetězové reakce, jehož možný extrémní důsledek ilustrovala exploze černobylského reaktoru. To v konečném důsledku vedlo v roce 2008 k ukončení celého projektu MAPLE za cenu obrovských finančních ztrát, aniž by reaktory byly uvedeny do ostrého provozu [18]. Nespustění reaktorů MAPLE nicméně vedlo k předběžným studiím budoucnosti molybden-techneciové produkce bez těchto reaktorů, které se ukázaly být velmi užitečné již necelý rok poté. Kanada tímto ztratila možnost nahradit zavírající NRU. V Evropě měly podobné záložní projekty více štěstí. Francouzský OSIRIS (plánované ukončení provozu 2016) by měl plně nahradit právě dokončovaný Jules Horowitz reaktor s plánovaným uvedením do provozu roku 2019. Nizozemí plánuje do roku 2024 uvést do chodu reaktor PALLAS jako náhradu za HFR. Belgický reaktor BR2 bude upgradován tak, aby byl schopen fungovat až do roku 2026. Vesměs ale půjde o přechod na nízkoobohacené ura-

nové terče se všemi z toho vyplývajícími důsledky.

2. Rozšíření sítě s využitím stávajících nízkokapacitních reaktorů

Některé z reaktorů, které byly zapojeny do výroby ^{99}Mo v době první techneciové krize, byly nyní zařazeny natrvalo do výrobní a distribuční sítě. V současnosti sdružuje Pracovní skupina reaktorů a izotopů asociace AIPES (Association of Imaging Producers and Equipment Suppliers – Asociace výrobců a dodavatelů vybavení pro zobrazování) celkem 10 reaktorů – mimo již zmíněných pěti dále polský reaktor MARIA, český LVR-15, argentinský RA-3 a australský OPAL využívající již nyní nízkoobohacené uranové terče a německý FRM-II, který ovšem v současnosti nezařazuje terče pro ^{99}Mo . Potenciální roční produkce těchto reaktorů (bez FRM-II) přibližně odpovídá ročnímu objemu produkce reaktoru HFR.

3. Alternativní způsoby výroby ^{99}Mo

Další cestou je výroba matečného generátorového nuklidu (^{99}Mo) jiným způsobem než bombardováním uranových (nízko- či vysokoobohacených) terčů. Spojené státy, které, ačkoli jsou největším odběratelem ^{99}Mo , nedisponují od uzavření reaktoru Cintichem v roce 1989 vlastním zdrojem tohoto izotopu, podporují projekty nevyužívající vysokoobohacený uran. GE Hitachi a Babcock & Wilcox, dvě největší společnosti, své plány zrušily z důvodu nerentability při současném stavu trhu. Další společnosti zahájily výzkum zcela nových metod produkce. Společnost NorthStar plánuje jednak od roku 2014 ozařovat přírodní molybden neutrony a konvertovat ^{98}Mo na ^{99}Mo na výzkumném reaktoru Univerzity v Missouri, jednak produkovat ^{99}Mo gama-ozařováním ^{100}Mo s cílem pokrýt 10–50 % potřeby ^{99}Mo v USA. Zároveň probíhají jednání o možné recyklaci ^{99}Mo z použitých generátorů. V neposlední řadě jsou prověřovány možnosti produkce ^{99}Mo na vysokoenergetických cyklotronech [19–21].

Kanada se především snaží pokrýt vlastní potřeby. Jednadvacet milionů kanadských dolarů bylo vládou uvolněno na tři projekty, které by mohly nahradit NRU. Prairie Isotope Production En-

terprise využívá technologie lineárních urychlovačů elektronů z přírodního molybdenu. Univerzita v Albertě a projekt TRIUMF ve Vancouveru spoléhají zase na cyklotronové technologie – nicméně nikoli k produkci ^{99}Mo , ale přímo ^{99m}Tc .

4. Alternativní způsoby výroby ^{99m}Tc

Kanadský program TRIUMF patří mezi průkopníky přímé výroby ^{99m}Tc ostřelováním molybdenových terčů na cyklotronech. Ačkoliv optimální energie se zdá být vyšší než 18 MeV, tj. standardní maximální energie klasických cyklotronů používaných pro produkci PET radiofarmak, i tyto cyklotrony jsou schopny produkovat technecium v dostatečné míře pro uspokojení potřeb nemocnic [22–25]. Nutnou podmínkou bude ovšem dostatečně hustá síť cyklotronů (pro Kanadu přibližně 24 cyklotronů). Jelikož kanadský model plánu nahrazení centralizované výroby ^{99}Mo decentralizovanou přímou výrobou technecia eliminuje závislost na reaktorech, jsou možnosti přímé cyklotronové výroby technecia prověřovány jinde na světě včetně Ústavu jaderné fyziky Akademie věd ČR či ÚJV, a. s. v Řeži [26–28]. Tento způsob nicméně bude vyžadovat jistý kompromis ze strany lékařských zařízení – ^{99m}Tc by bylo dodáváno namísto trvanlivějších a dle libosti kdykoli „podojitelných“ generátorů přímo ve formě roztoku technecistanu, podobně jako např. nyní fluorodeoxyglukóza pro PET, což s sebou ponese náročnější proces časového plánování vyšetření – v ideálním případě by mělo docházet ke koordinaci objednávek mezi nemocnicemi. V neposlední řadě bude cena takto vyrobeného technecia samozřejmě vyšší než doposud. Alternativní způsoby výroby ^{99}Mo i ^{99m}Tc budou nicméně muset zolat další překážku, tentokrát administrativní – bude si vyžadovat nové schválení, rozšíření či doplnění u příslušných státních kontrolních úřadů.

5. Nahrazení vyšetření ^{99m}Tc jiným vyšetřením

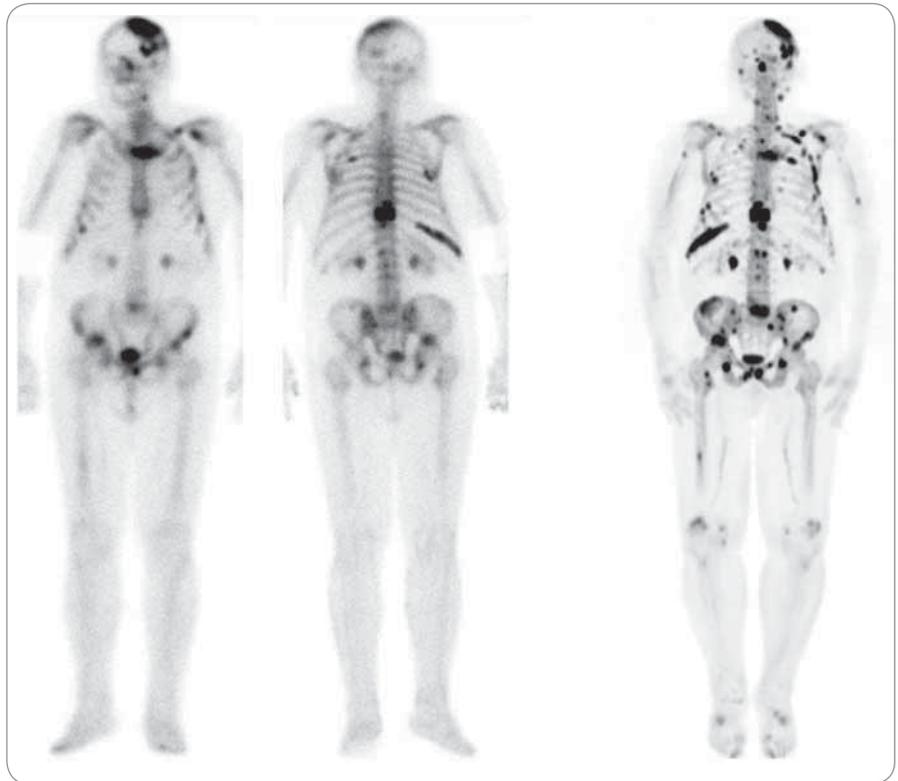
V době první techneciové krize bylo mnoho lékařských institucí nuceno přistoupit k alternativním způsobům vyšetření, ne vždy je však bylo možné provést na SPECT gamakamerách. Jednou

z výjimek bylo kardiologické vyšetření – detekce ischemie pomocí [^{99m}Tc]-ses-tamibi. Zde bylo v době krize „znovuobjeveno“ thallium-201 využívané do pozdních 80. let 20. století [29–31]. Vrátily se ovšem i nevýhody, kvůli kterým bylo thallium opuštěno ve prospěch technecia – nižší energie emitovaných fotonů a delší poločas rozpadu, vedoucí k vyšší radiální zátěži pacienta a v některých případech, zejména u obézních pacientů, k méně ostrým obrazům. Obrodu zažila také některá z PET radiofarmak, která nebyla díky vyšší ceně výroby i instrumentace schopná konkurovat techneciu – jednalo se zejména o [^{18}F]-fluorid sodný pro kostní skeny, pole drtivě ovládané [^{99m}Tc]-medronátem (MDP), viz obr. 1 [32,33] či jisté zvýšení využití [^{18}F]-FDG PET pro viabilitu myokardu. Tato alternativa byla nicméně využitelná pouze pro pracoviště vybavená PET a PET/CT skenery, jejichž pořizovací i provozní cena je výrazně vyšší a jejich četnost logicky výrazně nižší. Nicméně je záhodno na tomto místě konstatovat, že za jistý pozitivní přínos první techneciové krize lze považovat výraznou optimalizaci a zefektivnění některých ^{99m}Tc diagnostických protokolů vynucené drasticky omezenou dostupností izotopu v době krize.

Závěr

Od první techneciové krize uplynulo pět let. V jejich průběhu jasně vykristalizovala fakta o situaci a budoucnosti ohledně využití tohoto, pro nukleární medicínu prakticky nepostradatelného, izotopu.

- Následujících cca pět let bude poměrně kritických díky nevyhnutelnému uzavření reaktorů HFR a NRU. Zvýšením zapojením volných kapacit menších reaktorů nebude dopad uzavření natolik tvrdý, nicméně i zde dojde k přechodnému snížení dodávek. Přibližně po pěti letech lze očekávat spuštění nových reaktorových kapacit ve Francii a Nizozemí.
- Za účelem zajištění udržitelnosti a spolehlivosti produkčního a zpracovatelského řetězce bude nutno zásadním způsobem revidovat dlouholetou cenovou politiku spojenou s ^{99}Mo , která efektivně bránila včasné přípravě na



Obr. 1. Příklad porovnání [^{99m}Tc]-MDP scintigrafie (dvojice vlevo, přední a zadní projekce) a [^{18}F]-NaF PET (vpravo, 3D sumovaný obraz, tzv. MIP) u téhož pacienta.

Obě vyšetření jsou provedena zhruba ve stejném období, PET vykazuje vyšší senzitivitu (detekuje více ložisek), ale nižší specifitu (některá z ložisek nemusí souviset s onkologickým postižením, může jít o příčinu jinou). Navíc je patrný i vyšší (lepší) kontrast v PET obrazu, menší aktivita v tělovém pozadí (background).

takovou krizi ve smyslu budování alternativních zdrojů či náhradních kapacit. Nová cena bude muset odpovídajícím způsobem zohledňovat celý zpracovatelský řetězec, bude muset být akceptována státními autoritami, plátcí zdravotní péče, nemocnicemi a zohledněna při plánování lékařské péče.

- Alternativní produkce ^{99}Mo je možná stejně jako přímá produkce ^{99m}Tc . V obou případech s sebou opět přinese zvýšení ceny vyšetření využívajících ^{99m}Tc (planární scintigrafie či SPECT), v případě přímé výroby technecia pak přizpůsobení se nemocnic jině formě dodávek materiálu a event. součinnost mezi nemocnicemi při plánování objednávek a vyšetření.
- Lze očekávat, podobně jako za první techneciové krize, přesun části vyšetření k jiným metodám, nukleární magnetické rezonanci nebo pozitronové emisní tomografii. Zde bude výrazně záviset na stupni rozvoje dané metody

v dané oblasti a možnostech zásobování PET radiofarmaky. Za exemplární příklad může posloužit zvýšený zájem o ^{18}F -fluorid sodný v době první krize jako náhradu za [^{99m}Tc]-MDP skeny.

- SPECT byl doposud velmi levnou metodou nukleární medicíny – pořizovací cena gamakamery se pohybovala v řádu jednotek milionů korun, u SPECT/CT kolem 10 milionů, zatímco u PET/CT v řádu desítek milionů. Se zvýšením ceny technecia lze očekávat, že bude muset dojít k optimalizaci v síti pokrytí gamakamerami na odděleních nukleární medicíny – některé provozy doposud tuto metodu využívající by se po změně cen mohly stát nerentabilními.

První techneciová krize ukázala světu, že i v dnešním světě je možné, že majoritní zobrazovací metoda nukleární medicíny stojí na hliněných nohách. ^{99m}Tc bude mít v novém světě stále důle-

žitě místo, i s ohledem na stávající zobrazovací infrastruktury, jejichž kompletní přebudování např. na PET by bylo ekonomicky i geograficky nereálné. Je nutné si přiznat, že toto odvětví mohlo po dlouhá léta existovat a prosperovat na základě nepřímé podpory státu zajišťující umělé – a dále neudržitelné – ekonomické podmínky. Nyní je zapotřebí tento účet splatit, ať již nemalými investicemi do záchranných programů nebo zásadní cenovou reformou. K záchraně a zajištění dalšího hladkého fungování tohoto medicínského oboru bude nicméně nutná koordinovaná snaha na všech úrovních – produkční, zpracovatelské, uživatelské i kontrolní.

Literatura

1. Segrè E, Seaborg GT. Nuclear Isomerism in Element 43. *Phys Rev* 1938; 54(9): 772–772.
2. Segrè E, Wu CS. Some fission products of uranium. *Phys Rev* 1940; 57: 552–552.
3. Richards P, Tucker WD, Srivastava SC. Technetium-99m: an historical perspective. *Int J Appl Radiat Isot* 1982; 33(10): 793–799.
4. Sorensen LB, Archambault M. Visualization of the liver by scanning with Mo99 (molybdate) as tracer. *J Lab Clin Med* 1963; 62: 330–340.
5. Herbert R, Kulke W, Shepherd RT. The use of technetium 99m as a clinical tracer element. *Postgrad Med J* 1965; 41(481): 656–662.
6. Stang LG, Richards P. Tailoring the isotope to the need. *Nucleonics* 1964; 22(1): 146–148.
7. Harper PV, Andros G, Lathrop K. Preliminary observations on the use of six-hour ^{99m}Tc as a tracer in biology and medicine. *Semiannual Report of the Argonne Cancer Research Hospital* 1962; 18: 76–87.
8. Harper PV, Beck R, Charleston D et al. Optimization of a scanning method using Tc99m. *Nucleonics* 1964; 22: 50–54.
9. Smith EM. Properties, uses, radiochemical purity and calibration of Tc-99m. *J Nucl Med* 1964; 5(11): 871–882.
10. Smith EM. Internal dose calculation for ^{99m}Tc. *J Nucl Med* 1965; 6(4): 231–251.
11. Eckelman WC, Coursey BM (eds). *Technetium – 99m: generators, chemistry and preparation of radiopharmaceuticals*. Oxford: Pergamon 1982.
12. Eckelman WC. Unparalleled contribution of technetium-99m to medicine over 5 decades. *JACC Cardiovasc Imaging* 2012; 2(3): 364–368. doi: 10.1016/j.jcmg.2008.12.013.
13. Ruth T. Accelerating production of medical isotopes. *Nature* 2009; 457(7229): 536–537. doi: 10.1038/457536a.
14. Thomas GS, Maddahi J. The technetium short age. *J Nucl Cardiol* 2010; 17(6): 993–998. doi: 10.1007/s12350-010-9281-8.
15. de Aïdy EJ. The high flux reactor in petten resumes the vital roles of production of medical radioisotopes and nuclear research. *Tijdschrift voor nucleaire geneeskunde* 2010; 32(4): 586–591.
16. Hansell C. Nuclear medicine's double hazard: imperiled treatment and the risk of terrorism. *The Nonproliferation Review* 2008; 15(2): 185–208.
17. Pillai MR, Dash A, Knapp FF Jr. Sustained availability of ^{99m}Tc: possible paths forward. *J Nucl Med* 2013; 54(2): 313–323. doi: 10.2967/jnumed.112.110338.
18. Magnus B. Over budget, overdue and, perhaps, overdesigned. *CMAJ* 2008; 178(7): 813–814. doi: 10.1503/cmaj.080320.
19. Scholten B, Lambrecht RM, Cogneau M et al. Excitation functions for the cyclotron production of ^{99m}Tc and ⁹⁹Mo. *Appl Radiat Isot* 1999; 51(1): 69–80.
20. Takács S, Szűcs Z, Tárkányi F et al. Evaluation of proton induced reactions on ¹⁰⁰Mo: New cross sections for production of ^{99m}Tc and ⁹⁹Mo. *Radioanal Nucl Ch* 2003; 257(1): 195–201.
21. Celler A, Hou X, Bénard F et al. Theoretical modeling of yields for proton-induced reactions on natural and enriched molybdenum targets. *Phys Med Biol* 2011; 56(17): 5469–5484. doi: 10.1088/0031-9155/56/17/002.
22. Beaver JE, Hupf HB. „Production of ^{99m}Tc on a medical cyclotron: a feasibility study. *J Nucl Med* 1971; 12(11): 739–741.
23. Guérin B, Tremblay S, Rodrigue S et al. Cyclotron production of ^{99m}Tc: an approach to the medical isotope crisis. *J Nucl Med* 2010; 51(4): 13N–16N.
24. Alary B (ed.). *Cyclotron facility revolutionizes medical isotope manufacturing* [monograph on the Internet]. Canada: University of Alberta; 2013 [cited 2014 February]. Available from: <http://news.ualberta.ca/newsarticles/2013/july/cyclotron-facility-revolutionizes-medical-isotope-manufacturing>.
25. Loughheed T. Cyclotron production of medical isotopes scales up. *CMAJ* 2013; 185(11): 947. doi: 10.1503/cmaj.109–4525.
26. Lebeda O, Fikrle M. New measurement of excitation functions for (d,x) reactions on (nat)Mo with special regard to the formation of (95m)Tc, (96m+g)Tc, (99m)Tc and (99)Mo. *Appl Radiat Isot* 2010; 68(12): 2425–2432. doi: 10.1016/j.apradiso.2010.07.007.
27. Lebeda O, Pruszyński M. New measurement of excitation functions for (p,x) reactions on (nat)Mo with special regard to the formation of (95m)Tc, (96m+g)Tc, (99m)Tc and (99)Mo. *Appl Radiat Isot* 2010; 68(12): 2355–2365. doi: 10.1016/j.apradiso.2010.05.011.
28. Lebeda O, van Lier EJ, Štursa J et al. Assessment of radionuclidic impurities in cyclotron produced (99m)Tc. *Nucl Med Biol* 2012; 39(8): 1286–1291. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2012.06.009.
29. Marcassa C, Galli M, Temporelli PL et al. Technetium-99m sestamibi tomographic evaluation of residual ischemia after anterior myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25(3): 590–596.
30. Dilsizian V, Narula J. Seeking remedy for Molly's woe: time for a thallium pill? *JACC Cardiovasc Imaging* 2009; 2(3): 375–377. doi: 10.1016/j.jcmg.2008.12.008.
31. Strauss HW, Bailey D. Resurrection of thallium-201 for myocardial perfusion imaging. *JACC Cardiovasc Imaging* 2009; 2(3): 283–285. doi: 10.1016/j.jcmg.2009.01.002.
32. Damle NA, Bal C, Bandopadhyaya GP et al. The role of ¹⁸F-fluoride PET-CT in the detection of bone metastases in patients with breast, lung and prostate carcinoma: a comparison with FDG PET/CT and ^{99m}Tc-MDP bone scan. *Jpn J Radiol* 2013; 31(4): 262–269. doi: 10.1007/s11604-013-0179-7.
33. Igaru A, Mittra E, Dick DW et al. Prospective evaluation of (99m)Tc MDP scintigraphy, (18)F NaF PET/CT, and (18)F FDG PET/CT for detection of skeletal metastases. *Mol Imaging Biol* 2012; 14(2): 252–259. doi: 10.1007/s11307-011-0486-2.

Vitamin D jako významný steroidní hormon u karcinomu prsu

Vitamin D as an Important Steroid Hormone in Breast Cancer

Obermannová R.¹, Demlová R.^{2,3}, Drábová K.⁴, Melichárková K.⁴, Greplová K.³, Mrkvicová M.³, Zdražilová Dubská L.³, Vyzula R.^{1,3}, Valík D.³

¹Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

²Farmakologický ústav, LF MU, Brno

³Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

Souhrn

Vitamin D je vedle estrogenu a progesteronu třetí steroidní hormon, který plní významné biologické funkce při vývoji karcinomu prsu. Snížené plazmatické hladiny jeho hydroxyderivátu 25-OHD jsou robustně asociovány s vyšší incidencí karcinomu prsu a kratším celkovým přežitím. Ačkoliv neexistuje všeobecný konsenzus, většina autorů udává optimální hladinu 25-OHD přibližně 75–150 nmol/l (30 ng/ml) a hladiny nad 375 nmol/l (150 ng/ml) jako potenciálně toxické, spojené se zvýšeným rizikem hyperkalcemie. Dosud však nejsou k dispozici data o optimální hladině vitaminu D ve vztahu k riziku vzniku karcinomu prsu, jeho fenotypovým vlastnostem a celkovému průběhu nádorového onemocnění. Publikované práce uvádějí asociaci mezi vyššími hladinami 25-OHD a nižší agresivitou nádoru. Biologický efekt vitaminu D je ovšem komplexní děj, je závislý na hladině 25-OHD, ale i na aktivaci celé signální dráhy včetně receptoru pro vitamin D (VDR). Polymorfismus v genu *VDR* kódujícím steroidní receptor pro vitamin D může být spojen s vyšší incidencí nádoru prsu a mít negativní prognostický potenciál. Cílem této práce je podat ucelený přehled o současných poznatcích a dosavadních publikovaných datech týkajících se vztahu vitaminu D ke karcinomu prsu.

Klíčová slova

vitamin D – 25-hydroxyvitamin D – vitamin D receptor – karcinom prsu

Summary

Vitamin D is the third steroid hormone playing important biological roles in the development of breast cancer. Decreased plasma levels of its 25-hydroxyderivative, 25-OHD, display robust associations with higher incidence of breast cancer and shorter overall survival. Although no consensus exists, most authors agree that optimal plasma levels shall be within 75–150 nmol/l whereas levels higher than 375 nmol/l can be potentially toxic with higher risk of hypercalcemia. To date, no data are available on the optimal levels of vitamin D related to the risk of breast cancer development, its phenotype features and the course of the disease. Published studies mostly describe associations among higher levels of 25-OHD and lower biologically aggressiveness of the tumor. The polymorphism of *VDR* gene coding for the steroid receptor for vitamin D may be associated with higher disease incidence and also be of negative prognostic significance in breast cancer. This review presents an overall summary of the current knowledge and publications on vitamin D and breast cancer.

Key words

vitamin D – 25-hydroxyvitamin D – vitamin D receptor – breast cancer

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a BBMRI_CZ (LM2010004).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and BBMRI_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Radka Obermannová
Klinika komplexní onkologické péče
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: obermannova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 29. 1. 2014

Přijato/Accepted: 5. 5. 2014

Úvod

Karcinom prsu představuje onemocnění s celosvětově vysokou incidencí. V České republice se jedná o nejčastější zhoubný novotvar u žen a v letech 2005–2009 představoval 24,3 % všech nově diagnostikovaných malignit v ženské populaci. Incidence v roce 2010 představuje 66,37 nádorů na 100 000 žen s mortalitou 14,59 nádorů na 100 000 žen [1]. V současnosti neexistují preventivní opatření, která by zásadně ovlivňovala incidenci karcinomu prsu. Ve Spojených státech amerických se podává jako chemoprevence pouze u vysoce rizikových jedinců antiestrogen tamoxifen, případně raloxifen či inhibitory aromatáz [2–4], ale vzhledem k jejich výrazným nežádoucím účinkům nelze tuto strategii uplatnit plošně. Efekt těchto látek je navíc omezen pouze na hormonálně senzitivní onemocnění, tedy onemocnění s expresí estrogenových (ER) a progesteronových (PR) receptorů. Je tudíž zjevné, že by bylo potřeba najít jednoduché chemopreventivní agens fungující u všech typů karcinomu prsu [5].

Vitamin D je steroidní hormon hrající významnou roli v metabolismu kalcia, fosfátů a mineralizaci kostí. Pod pojmem vitamin D rozumíme dva ve vodě nerozpustné sekosteroidy – ergokalciferol (vitamin D_2) a cholekalciferol (vitamin D_3). Tyto dvě formy se vzájemně liší strukturou postranního řetězce, fyziologické účinky obou látek na lidský organizmus se ale významněji neliší, přičemž hladinu vitaminu v séru více ovlivňuje cholekalciferol. Vitamin D je získáván dvěma cestami: majoritní – přeměnou ze 7-dehydrocholesterolu v kůži vlivem slunečního záření, a minoritní – příjmem potravou. Na aktivní formu je přeměněn dvojitou hydroxylací, v játrech na 25-hydroxycholekaliferol (25-OHD), následně v ledvinách cestou enzymu 1-alfa hydroxylázy na aktivní formu 1,25-dihydroxycholekaliferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ = vitamin D_3). Vitamin D se poté váže na vitamin D receptor (VDR), který je fyziologicky přítomný v mnoha tkáních včetně mléčné žlázy [6]. Jeho exprese byla také prokázána u všech forem karcinomu prsu, jak hormonálně senzitivních (estrogen a progesteron citlivých), tak hormonálně

neaktivních. Kromě přímého efektu inhibice buněčného cyklu a indukce apoptózy ovlivňuje vitamin D i produkci estrogenů [7–9]. Nedostatek vitaminu D je považován za jeden z rizikových faktorů vzniku a rozvoje nádorových onemocnění včetně karcinomu prsu [10]. První zmínky o vztahu vitaminu D a karcinomu prsu se datují do 90. let 20. století, kdy byly publikovány výsledky ekologických studií. Vyšší incidence nádorového onemocnění souvisela se zeměpisnou šířkou, tedy s nižší expozicí slunečnímu svitu [11–17]. Některé velké kohortové studie udávají inverzní vztah mezi perorálním příjmem vitaminu D a rizikem karcinomem prsu [18–21]. V roce 2013 byla publikována metaanalýza a systematický přehledový článek hodnotící význam suplementace vitaminem D v redukci rizika karcinomu prsu [22]. Souvislost mezi suplementací vitaminem D a kalcium a redukcí rizika karcinomu prsu nebyla prokázána. Limitací této práce byl soubor pouze postmenopauzálních žen, podávání nízkých preventivních dávek cholekalciferolu a kalcia a hodnocené dvě studie, které jediné splnily kritéria analýzy.

Inverzní vztah mezi hladinou 25-OHD, prekurzorem aktivního vitaminu D, byl potvrzen jen u případových studií. Výsledky doposud provedených prospektivních studií nejsou konzistentní. Metaanalýza čtyř prospektivních studií z roku 2010 nenalezla signifikantní inverzní vztah mezi hladinou 25-OHD a rizikem vzniku karcinomu prsu [23], zatímco následná metaanalýza, která zahrnovala další dvě prospektivní studie, inverzní stav potvrdila [24,25]. Cílem tohoto sdělení je podat ucelený přehled aktuálních dat týkajících se vztahu metabolismu vitaminu D a rozvoje karcinomu prsu.

Biologický efekt vitaminu D

Vitamin D hraje kromě zásadní role v homeostáze vápníku významnou úlohu v řadě biochemických procesů. Signalizaci spouští většinou prostřednictvím receptoru vitaminu D, který náleží do rodiny steroidních nukleárních receptorů. Vazbou vitaminu D na VDR je indukována buněčná diferenciaci, inhibována proliferace a regulována apoptóza u normálních i nádorových buněk včetně

karcinomu prsu, dále je potlačena angiogeneze a iniciovány imunomodulační účinky cestou ovlivnění monocytů a lymfocytů. Aktivní látka, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, působí antikarcinogenně cestou regulace VDR-dependentní transkripce až 200 genů včetně *CDKN1A*, *CDKN1B*, *c-fos* a *c-myc* [26]. Některé studie prokázaly, že $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibuje syntézu i biologický účinek estrogenů [7–9]. Aktivní forma $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pravděpodobně suprimuje tvorbu estrogenů cestou inhibice genu kódujícího aromatázu, enzymu, který je odpovědný za konverzi androgenu na estrogenu. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ také potlačuje expresi estrogenového receptoru, jaderného receptoru, který zprostředkovává biologický efekt estrogenu [9]. Oba mechanismy tak přispívají k inhibici signalizace prostřednictvím estrogenů. Vztah perorálního příjmu vitaminu D a exprese ER a PR hodnotila řada studií s nekonzistentními výsledky [19,20,21,27]. Analoga vitaminu D inhibují růst nádorů prsu (benigních i maligních) a na estrogenu nezávislým mechanismem redukuje proliferativní efekt insulin-like growth factor 1 (IGF-1), jenž je významný mitogen [28]. Na zviřším modelu byl prokázán potencující vliv vitaminu D na účinek tamoxifenu v rámci terapie karcinomu prsu [29].

Tzv. „negenomový“ efekt vitaminu D (efekt zprostředkovaný membránovými receptory) je rychlý a nezávislý na transkripci, ačkoliv transkripci zkříženě ovlivňuje prostřednictvím jiných signálních drah. Zatím neexistuje jednoznačný názor na to, jak je negenomový efekt zprostředkován. Pravděpodobně je závislý na „neklasickém“ membránovém receptoru (memVDR) a 1-alfa, 25-OHD membrane-associated rapid-response steroid binding protein (1-alfa,25-(OH) $_2$ D-MARRS). Nejznámější pozitivní negenomový efekt vitaminu D je rychlá absorpce vápníku ze střeva a zvýšení intracelulární hladiny vápníku vznikající vazbou na membránový receptor, následnou aktivací proteinkinázy C (PKC) a rychlým otevřením vápníkových kanálů [30]. Bijlsma et al objevili v roce 2011 další významný negenomový efekt vitaminu D – inhibici sonic-hedgehog (SHH) signální dráhy, která je v případě vlastní dysregulace

významným stimulatorem karcinogeneze [31]. Tang et al [32] v roce 2011 potvrdili v *in vitro* i *in vivo* studiích, že vitamin D inhibuje proliferaci v buňkách bazocelulárního karcinomu prostřednictvím VDR nezávislého mechanismu. Cestou Wnt dráhy způsobuje downregulaci SHH dráhy v buňkách bazocelulárního karcinomu.

Jaká je optimální plazmatická hladina 25-OHD ve vztahu ke karcinomu prsu?

Hydroxylovaný metabolit 25-OHD představuje zásobní frakci vitamínu D a je vhodným cílem k monitorování zejména pro svoje stabilní hladiny v plazmě a dlouhý eliminační poločas. Plazmatická hladina 25-OHD je výsledkem hydroxylace neaktivní formy vitamínu D získaného endogenně (konverzí v kůži vlivem slunečního svitu) a exogenně (perorálním příjmem). Hydroxylace probíhá v játrech prostřednictvím enzymu 25-hydroxylázy kódovaným genem *CYP27A1*. Následná hydroxylace v ledvinách prostřednictvím enzymu 1-alfa-hydroxylázy, kódovaným genem *CYP27B1*, vede k vzniku aktivní formy vitamínu D. Řada tkání včetně tkáně mléčné žlázy i karcinomu prsu je schopna přímé konverze cirkulujícího 25-OHD na aktivní formu 1,25-OHD prostřednictvím 1-alfa-hydroxylázy [29]. Prakticky to znamená, že jsou tkáně samy schopny autokrinní nebo parakrinní sekrecí enzymu 1-alfa-hydroxylázy konvertovat dostupný prekurzor 25-OHD na aktivní metabolit, a tím modifikovat biologickou dostupnost vitamínu D. Analogicky existuje tkáňová overexprese 24-hydroxylázy, kódované *CYP24A1*, klíčového enzymu v katabolismu aktivních forem vitamínu D, jehož vlivem dochází k degradaci aktivního vitamínu D. Z toho vyplývá, že hladina 25-OHD nemusí nutně odrážet lokální biologické a patofyziologické efekty. Přesto ale zůstává nejjednodušším prostředkem sledování stavu vitamínu D v těle. Snaha definovat optimální plazmatickou hladinu 25-OHD obecně v souvislosti s incidencí chronických chorob (kardiovaskulárních, neurologických, endokrinních, ale i nádorových onemocnění), v našem případě s prevencí rizika vzniku karcinomu prsu, byla předmě-

Tab. 1 Kritéria hladiny 25-OHD u zdravých dle NHANES 2011 (National Health and Nutrition Examination Survey).

Výsledky	Sérová hladina 25-OHD	
	nmol/l	ng/ml
deficit	< 30	< 12
neadekvátní hladiny	30–50	12–20
optimální	≥ 50	≥ 20
rizikové	> 125	> 50
toxická	≥ 375	≥ 150

Legenda – sérové hladiny 25-OHD u zdravých

nmol/L	ng/mL	
< 30	< 12	asociovány s vitamin D deficiencí, vedoucí ke křivici u dětí, osteomalácií u dospělých
30–50	12–20	neadekvátní pro metabolismus skeletu a celkové zdraví u zdravých osob
≥ 50	≥ 20	adekvátní
> 125	> 50	potenciálně toxické, vedoucí k nežádoucím účinkům, obzvláště při hladinách > 150 nmol/L (> 60 ng/mL)

tem řady publikovaných studií. Z dosažených dat vyplývá, že vyšší hladina je obecně asociována s lepším celkovým zdravím [26] a nižší incidencí chronických chorob.

Hodnota hladiny metabolitu v krvi v závislosti na farmakologické suplementaci vitamínem D je těžko předvídatelná. Závisí na individuální variabilitě, dietě, absorpci, metabolismu, BMI, expozici slunci atd. Ačkoliv neexistuje všeobecný konsenzus, většina autorů udává optimální hladinu 25-OHD přibližně 50–125 nmol/l (20–50 ng/ml) a hladiny nad 375 nmol/l (150 ng/ml) jako potenciálně toxické, spojené se zvýšeným rizikem hyperkalcemie (tab. 1). Dle Goodwin et al [33] jsou pravděpodobně výhodnější hladiny okolo 75 nmol/l (30 ng/ml), ideálně pak 90–100 nmol/l (36–40 ng/ml).

Plazmatické hladiny 25-OHD v nemoci a předchorobí

Crew et al [34] ve své retrospektivní případové studii porovnali hladiny 25-OHD u pacientek s karcinomem prsu a zdravé populace. Do analýzy bylo zahrženo 1 508 pacientek, u nichž byl v letech 1996–1997 diagnostikován *in situ*

karcinom nebo invazivní karcinom, a 1 556 kontrolních subjektů. Průměrná plazmatická koncentrace 25-OHD byla naměřena 27,1 nmol/l (13,0 ng/ml) u pacientek s karcinomem prsu a 29,7 nmol/l (15,1 ng/ml) u zdravých žen ($p < 0,0001$). Plazmatická hladina 25-OHD byla inverzně asociována s rizikem karcinomu prsu (OR 0,56; 95% CI 0,41–0,78). Ve srovnání s deficitem vitamínu D, (hladinou 25-OHD < 50 nmol/l (20 ng/ml)), byly hladiny > 100 nmol/l (40 ng/ml) spojeny s poklesem rizika vzniku karcinomu prsu. Redukce rizika byla větší u postmenopauzálních žen (OR 0,46; 95% CI 0,09–0,83) a efekt nebyl závislý na expresi estrogenových a progesteronových receptorů. Hladina 25-OHD₃ ≥ 100 nmol/l (40 ng/ml) měla v uvedené studii preventivní vliv na vznik karcinomu prsu. Goodwin et al [33] sledovali mortalitu pacientek s karcinomem prsu v závislosti na hladině vitamínu D. Pacientky (bez suplementace) s hladinou vitamínu D < 50 nmol/l (20 ng/ml) v době diagnózy měly 94% pravděpodobnost metastatického onemocnění a 73% pravděpodobnost úmrtí v průběhu 10 let sledování. Pouze 24 % pacientek mělo adekvátní hladinu vitamínu D

(> 72 nmol/l) v době diagnózy. Podle sdružené analýzy prováděné v USA a Velké Británii měly pacientky s hladinou > 125 nmol/l (50 ng/ml) o 50 % nižší riziko vzniku nádoru prsu než pacientky s deficiencí 25-OHD. Denní příjem 1 000 IU vedl k zvýšení hladin 25-OHD o 25 nmol/l (10 ng/ml), optimální denní dávka by mohla být 3 000–4 000 IU, tedy vyšší než dávka doporučovaná Institute of Medicine (IOM). Aplikace denní dávky vitamínu D 4 000 IU po dobu pěti měsíců vedla bez nežádoucích účinků k dosažení požadovaných hladin u 88 % sledovaných osob [35]. V přehledovém článku o klinických datech u zdravých osob byla dokonce uvedena bezpečná denní dávka vitamínu D \geq 10 000 IU [36].

Podávané vysoké dávky vitamínu D nemusí být vždy toxické. V jednoramenné studii byla postmenopauzálním pacientkám léčených inhibitory aromatáz podávána dávka vitamínu D 50 000 IU týdně [37], ve studii fáze II byla pacientkám s metastatickým karcinomem prsu podávána dávka vitamínu D 10 000 IU denně po dobu čtyř měsíců [38]. V rámci ani jedné z nich nebyly zaznamenány projevy toxicity jako hyperkalcemie, hyperkalciurie nebo nefrolithiáza. Přesto zůstává nejasné, zda bude mít substituce vyššími dávkami vitamínu D protektivní vliv na redukci rizika vzniku karcinomu prsu u vysoce rizikových premenopauzálních pacientek. Dodnes nebyla publikována prospektivní studie, která by hodnotila význam substituce v průběhu léčby onkologického onemocnění, a většina doposud publikovaných prací vycházela pouze z prediagnostických hladin vitamínu D.

Stadium onemocnění, grade, hormonální léčba a hladina 25-OHD

Vitamin D by mohl být užitečnou a levnou součástí léčby pacientek s karcinomem prsu. Neuhouser et al [28] provedli analýzu hladin vitamínu D u populace pacientek s historií karcinomu prsu. U 75,6 % z nich konstatovali insuficienci až deficit 25-OHD a průměrná hladina byla stanovena na $24,8 \pm 10,4$ ng/ml. Nižší hladiny byly nalezeny u afrického a hispánského etnika. Studie hodnotila věk, BMI, etnikum, geografii, sezónní

vliv, fyzickou aktivitu, terapii karcinomu prsu a podání tamoxifenu. Po eliminaci všech demografických variabilit a rozdílů vyplývajících ze životního stylu zůstalo stadium onemocnění signifikantním prediktorem nižších hladin 25-OHD. Ženy s lokalizovaným či lokálně pokročilým onemocněním vykazovaly nižší hladinu 25-OHD než ty s karcinomem *in situ*.

Autoři dále studovali efekt tamoxifenu v souvislosti s hladinou 25-OHD. Historicky pouze jedna práce na zvířecím modelu prokázala vztah vitamínu D a tamoxifenu [29]. Kombinace byla 10–100krát efektivnější než monoterapie analogem vitamínu D. Přidáním vitamínu D došlo k navýšení efektu tamoxifenu (současně k redukci dávky a tím poklesu nežádoucích účinků tamoxifenu). V Neuhouserově práci byly u pacientek léčených tamoxifenem naměřeny vyšší hladiny 25-OHD, tamoxifen byl tedy signifikantní prediktor hladiny 25-OHD. Vztah k hormonálním receptorům bohužel nelze hodnotit, neboť nebyly vyšetřeny u jedné třetiny zařazených pacientek.

V kanadské studii Goodwina et al [33] naměřili deficitní či insuficientní vstupní hladinu 25-OHD u 76 % pacientek s karcinomem prsu. Prokázali inverzní vztah mezi hladinou 25-OHD a BMI, markery inzulinové rezistence (inzulin, C-peptid), přičemž hladiny 25-OHD byly signifikantně nižší u pacientek s high-grade tumory. Dále prokázali statisticky významnou souvislost mezi deficitní hladinou vitamínu D a dobou do progresu (disease-free survival – DFS) a kratším celkovým přežitím (overall survival – OS) (10letý DFS 69 vs 83 % (deficitní vs dostatečné hladiny), 10letý OS 74 vs 85 %). Výsledek nebyl ovlivněn věkem, velikostí tumoru, gradem, stavem estrogenových a progesteronových receptorů adjuvantní chemoterapií, hormonoterapií ani ročním obdobím.

Stejně tak autoři německé studie z roku 2007 [39] uvádějí signifikantní inverzní vztah mezi hladinou 25-OHD a rizikem vzniku karcinomu prsu u postmenopauzálních žen, přičemž hormonální substituční léčbu a počet těhotenství shledali jako modifikátory shora uvedeného vztahu. Ženy, které podstoupily hormonální substituční léčbu, a ženy

s vyšším počtem těhotenství měly vyšší hladiny 25-OHD a nižší riziko vzniku karcinomu prsu, což pravděpodobně vysvětluje nižší expozice estrogenům.

Plazmatická hladina 25-OHD a fenotyp karcinomu prsu

Plazmatická hladina vitamínu D je nyní studována v souvislosti s fenotypovými vlastnostmi karcinomu prsu: luminal A, luminal B, HER2+ ER–, triple-negativní (basal-like). Již na buněčných kulturách odvozených od karcinomu prsu byla *in vitro* prokázána fenotypová souvislost s hladinou vitamínu D. Nízké hladiny vitamínu D jsou asociovány s progresí více agresivního fenotypu (triple-negativního) [40]. Rainville et al sledovali hladinu 25-OHD v souvislosti s fenotypem karcinomu prsu (luminal A, luminal B, HER2+ ER–, triple-negativní) [41]. U triple-negativního fenotypu detekovali nejnižší hladiny 25-OHD a také nejvyšší procento pacientek s deficitem. Pro zajímavost uvádíme hladiny 25-OHD – zdraví dobrovolníci 90 ± 40 nmol/l, pacientky s karcinomem prsu 76 ± 50 nmol/l, luminal A 79 ± 50 nmol/l, luminal B 75 ± 30 nmol/l, HER2+ ER– 93 ± 30 nmol/l, triple-negativní 50 ± 20 nmol/l. Ve skupině pacientek s karcinomem prsu byla naměřena signifikantně nižší hladina 25-OHD ($p < 0,015$), ale nebyl nalezen signifikantní rozdíl v rámci stadia onemocnění. Hladina 25-OHD u triple-negativního karcinomu prsu byla také statisticky významně nižší oproti skupině zdravých dobrovolníků. Hladina vitamínu D má pravděpodobně významný vliv na nádorový růst, fenotypové vlastnosti a biologické chování karcinomu prsu. Tuto hypotézu podporují i data zjištěná u populace Afroameričanek, tzn. vyšší mortalitu v souvislosti s karcinomem prsu, nižší hladinou 25-OHD a vysokou incidencí agresivního triple-negativního nebo basal-like fenotypu (39 %) [41,42].

Laporta et al na zvířecím modelu (potkan) triple-negativního karcinomu prsu testovali význam VDR pro 1,25-(OH)D zprostředkovanou protinádorovou antiproliferativní aktivitu [43]. Model potvrdil hypotézu, že 1,25-(OH)2D cestou VDR koordinovaně suprimuje proteiny, jež jsou zásadní k přežití triple-negativ-

ních, basal-like, nádorových buněk karcinomu prsu.

VDR genový polymorfismus a karcinom prsu

Vitamin D receptor (VDR) je nukleární steroidní receptor, který po navázání ligandu 1,25-OHD ovlivňuje genovou expresi. VDR je exprimován téměř ve všech tkáních a orgánech lidského těla a signalizace prostřednictvím VDR vede k transkripci řady genů (až 3 % lidského genomu), jež kontrolují buněčný cyklus, ovlivňují apoptózu a metastatický potenciál. Je přítomný v normální mléčné žláze, kde funguje jako protipól estrogeny řízené proliferace a podporuje diferenciaci. Dosavadní publikovaná data ukazují, že vitamin D i polymorfismus VDR pravděpodobně ovlivňují riziko vzniku karcinomu prsu [44]. Řada klinických studií je věnována polymorfismu VDR a dosud bylo popsáno více než 470 variant VDR. VDR polymorfismus je spojen s vyšší incidencí nádorového onemocnění a má negativní prognostický vliv, ačkoliv výsledky studií jsou často rozporuplné. Köstner et al [45] analyzovali relevanci genového polymorfismu VDR v rámci studia maligních onemocnění. Byla prokázána signifikantní souvislost mezi polymorfizmy VDR (označované jako FokI, BsmI, TaqI, ApaI, poly (A)) a vznikem karcinomu prsu. Riziko vzniku karcinomu prsu bylo asociováno s polymorfizmy BsmI, FokI, zatímco prognóza onemocnění souvisela spíše s genovými variantami BsmI a TaqI. V rámci uvedené práce byla provedena metaanalýza 21 studií hodnotících polymorfizmy FokI, BsmI, ApaI a TaqI. FokI polymorfismus byl spojen se signifikantně zvýšeným rizikem karcinomu prsu. V subanalýze byla signifikantní asociace evidentní v případě FokI polymorfismu v evropské populaci, naopak u BsmI, ApaI and TaqI nebyla souvislost se vznikem karcinomu prsu signifikantní. FokI polymorfismus by tak mohl být citlivým biomarkerem rizika vzniku karcinomu prsu, zvláště pak v evropské populaci [45,46].

Ke stejnému závěru pak dospěli i Sinotte et al [47], studující asociaci polymorfismu VDR, konkrétně FokI a BsmI, v rámci dvou nezávislých studií na stejné

Tab. 2. Souvislost mezi VDR polymorfizmem a rizikem vzniku karcinomu prsu.

	Köstner et al [45]	Sinotte et al (1) [47] n = 243	Sinotte et al (2) [47] n = 616	Sinotte et al (1,2) [47] n = 859
FokI ff vs FF	OR = 1,15 95% CI 1,03–1,28	OR = 1,22 95% CI 0,76–1,95	OR = 1,44 95% CI 1,05–1,99	OR = 1,33 95% CI 1,03–1,73
FokI ff vs Ff	OR = 1,14 95% CI 1,03–1,26			
evropská populace FokI ff vs FF	OR = 1,16 95% CI 1,04–1,30			
evropská populace FokI ff vs Ff	OR = 1,15 95% CI 1,04–1,28			
FokI a pozitivní rodinná anamnéza		FF OR = 1,0 Ff OR = 0,56 95% CI 0,24–1,32 p = 0,18 ff OR = 0,41 95% CI 0,15–1,16 p = 0,14	FF OR = 1,0 Ff OR = 0,79 95% CI 0,44–1,40 p = 0,41 ff OR = 0,78 95% CI 0,37–1,69 p = 0,54	FF OR = 1,0 Ff OR = 0,73 95% CI 0,46–1,17 p = 0,19 ff OR = 0,66, 95% CI 0,36–1,19 p = 0,17
FokI a negativní rodinná anamnéza		FF OR = 1,0 Ff OR = 1,01 95% CI 0,67–1,51 p = 0,98 ff OR = 1,51 95% CI 0,89–2,58 p = 0,13	FF OR = 1,0 Ff OR = 1,44 95% CI 1,10–1,88 p = 0,007 ff OR = 1,65–2,35 95% CI 1,16–2,35 p = 0,005	FF OR = 1,00, Ff OR = 1,27 95% CI 1,02–1,58 p = 0,003 ff OR = 1,57 95% CI 1,18–2,10 p = 0,002
OR – odds ratio				

populaci pacientek, navíc hodnotili souvislost s rodinnou anamnézou. V obou studiích i v kombinovaném rameni byla pozorována signifikantní interakce mezi FokI a negativní rodinnou anamnézou (tab. 2). BsmI Bb + bb (heterozygot + recesivní homozygot) varianty byly asociovány s nesignifikantním zvýšením rizika napříč studovanými skupinami bez ohledu na rodinnou anamnézu. Z výsledků vyplývá, že vitamin D jako biologický regulátor pravděpodobně ovlivňuje riziko vzniku karcinomu prsu. Variabilita výsledků u polymorfismu FokI v rámci více publikovaných dat je pravděpodobně dána proporcionálním zastoupením pacientek s rozdílnou rodinnou anamnézou [45]. Wang et al [48] potvrdili v kavkazské populaci roli TaqI polymorfismu v riziku vzniku karcinomu prsu. Tato hypotéza nebyla potvrzena

u asijské populace. Stejní autoři publikovali negativní výsledky v rámci metaanalýzy v případě polymorfismu ApaI.

Je současná doporučená dávka vitamínu D dostatečná k prevenci rizika karcinomu prsu?

Současná doporučení v České republice se týkají suplementace optimální v metabolismu kalcia a terapii osteoporózy. Doporučená dávka v této indikaci je 800 IU/den, jde tedy o řádově nižší dávku, než je dávka uvedená. Crew et al [34] srovnávali hladinu 25-OHD u skupiny premenopauzálních pacientek léčených adjuvantní chemoterapií za současné suplementace kalcie (1 000 mg/den) a vitamínem D₃ (400 IU/den). Před zahájením terapie pouze 6 % pacientek vykazovalo dostatečnou hladinu 25-OHD ≥ 75 nmol/l (30 ng/ml) a po

roce suplementace vzrostl tento podíl na 11 %. 74 % pacientek mělo hladiny 25-OHD v pásmu deficience, tento podíl klesl po roce terapie na 60 %. Ve skupině s neadekvátní hladinou < 30 nmol/l (12 ng/ml) se podíl po roční terapii snížil z původních 11 % na 7 %. Na základě dosažených výsledků konstatovali skutečnost, že současná suplementace vitamínem D optimální pro kostní metabolismus není dostatečná k redukci rizika recidivy karcinomu prsu.

Metaanalýza 18 randomizovaných klinických studií, jejichž cílem bylo zhodnocení incidence fraktur s dávkou k substituci od 300–2 000 IU zahrnující 57 000 účastníků, prokázala redukci mortality o 7 % ve skupině léčených vitamínem D [49]. Jiná data – analýzy dvou randomizovaných placebem kontrolovaných studií – tuto skutečnost nepotvrdila. Problém uvedených dat je, že ve srovnávacím rameni byla dovolena substituce kalcie i vitamínem D [50,51].

Aktuální studie

Současně probíhající studie jsou zaměřeny na preventivní podávání derivátů vitamínu D s cílem zhodnocení rizika nejen nádorových, ale i jiných chronických chorob. Bohužel žádná z plánovaných studií neanalyzuje vstupní hladinu 25-OHD ani neplánuje substituci dle monitorování hladiny 25-OHD. Navíc je u všech účastníků povolena substituce běžná k prevenci osteoporózy, což metodologicky ztěžuje interpretaci výsledků. Z plánovaných studií uvádíme americkou studii VITAL (n = 20 000) se zaměřením na kardiovaskulární a nádorové choroby s dávkou vitamínu D 2 000 IU/den. Výsledky budou k dispozici v roce 2017. Finská studie FIND (n = 18 000) s dávkou 1 600 IU/den pro muže a 3 200 IU/den pro ženy zahájena v roce 2013 a cílená na stejné spektrum pacientů včetně diagnózy cukrovky přinese výsledky v roce 2020. Britská studie VIDAL (n = 20 000) je zaměřena na hodnocení vztahu vitamínu D a dlouhodobé při substituci dávkou 2 000 IU/den. Její výsledky můžeme očekávat v roce 2017. Studie fáze II (NCT01097278) hodnotí význam suplementace vysokými dávkami vitamínu D u premenopauzálních pacientek s high-risk karcinomem

prsu a její výsledky jsou předpokládány v roce 2015.

Z aktivních studií u diagnózy karcinomu prsu jmenujme studii fáze III VITACAL, která srovnává konvenční dávkovou suplementaci s vysokými dávkami vitamínu D₃ (aplikovanými dle vstupních hladin 25-OHD) v průběhu neoadjuvantní a adjuvantní chemoterapie u pacientek s karcinomem prsu (NCT01480869). Studie fáze II ICARUS sleduje klinický efekt a odpověď v biomarkerech u pacientek s karcinomem prsu, u nichž probíhá suplementace vitamínem D 40 000 IU/den v průběhu časového intervalu mezi stanovením diagnózy a operací (NCT01948128).

Závěr

Ačkoliv počet publikací věnovaných karcinomu prsu a vitamínu D vzrostl v průběhu posledního desetiletí přibližně 7krát, neexistuje konsenzus, který by vedl k doporučení dávky do běžné klinické praxe ve směru k prevenci či i doplňkové terapii maligních chorob. Z uvedených prací jednoznačně vyplývá souvislost mezi dlouhodobými nedostatečnými hladinami vitamínu D a rizikem karcinomu prsu, stejně tak kratší doba progresu i celkového přežití pacientek s již manifestovaným karcinomem prsu. Vitamin D se jeví vedle estrogenu a progesteronu třetím významným steroidním hormonem, který má vliv na rozvoj a průběh karcinomu prsu. Vzhledem k interindividuální variabilitě dané pravděpodobně i genovým polymorfismem VDR, metabolismem, etnickým rozdílem i geografickým okolnostem je v rámci suplementace stále striktně doporučováno řídit se hladinou 25-OHD. Z hlediska chronobiologie vitamínu D je vhodné období ke stanovení hladiny vitamínu D konec zimních měsíců (březen), kdy jsou hladiny 25-OHD nejnižší; naopak v září je v naší zeměpisné šířce průměrná plazmatická hladina nejvyšší. Ve světle současných poznatků je optimální hladina 75–150 nmol/l (30–60 ng/ml). K jejímu dosažení je ideální týdenní dávka 20 000–30 000 IU. Na našem pilotním souboru pacientů s karcinomem prsu a kolorektálním karcinomem léčených první linií paliativní chemoterapie vedla aplikace těchto

dávek k bezpečnému vzestupu na cílovou hladinu 90–115 nmol/l při monitorování hladin 1krát za dva měsíce. S ohledem na nízkou expozici slunečnímu svitu v naší zeměpisné šířce je vhodné hladiny monitorovat v průběhu zimních a časných jarních měsíců. Další krok při sledování prognózy pacientů léčených pro disseminované nádorové onemocnění se současnou suplementací vitamínem D dle hladin 25-OHD je stanovení souvislosti s genovým polymorfismem typu FokI, BsmI, dále souvislosti s expresí ER a PR, HER2. Dosavadní data neprokázala vztah závislosti efektu vitamínu D na expresi ER a PR, což umožňuje jeho neselektivní použití u všech skupin karcinomu prsu. Z preklinických i klinických dat se jeví nadějně substituce vitamínem D u prognosticky nejméně příznivého fenotypu triple-negativního karcinomu prsu.

Literatura

1. Svod.cz [internetová stránka]. Dušek L, Mužík J, Kubásek M et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, Česká republika; c2005, [citováno 5. února 2014]. Dostupný z: <http://www.svod.cz>
2. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(18): 1371–1388.
3. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: The NSABP study of tamoxifen and raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA* 2006; 295(23): 2727–2741.
4. Goss PE, Ingle JN, Alés-Martínez JE et al. Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2011; 364(25): 2381–2391. doi: 10.1056/NEJMoa1103507.
5. Crew KD. Vitamin D: are we ready to supplement for breast cancer prevention and treatment? *ISRN Oncol* 2013; 2013: 483687. doi: 10.1155/2013/483687.
6. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357(3): 266–281.
7. Krishnan AV, Swami S, Peng L et al. Tissue selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology* 2010; 151(1): 32–42.
8. James SY, Mackay AG, Binderup L et al. Effects of a new synthetic vitamin D analogue, EB1089, on the oestrogen-responsive growth of human breast cancer cells. *J Endocrinol* 1994; 141(3): 555–563.
9. Stoica A, Saceda M, Fakhro A et al. Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D in MCF-7 cells. *J Cell Biochem* 1999; 75(4): 640–651.
10. Garland FC, Garland CF, Gorham ED et al. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med* 1990; 19(6): 614–622.
11. Apperley FL. The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer Res* 1941; 1: 191–195.
12. Studzinski GP, Moore DC. Sunlight – can it prevent as well as cause cancer? *Cancer Res* 1995; 55(18): 4014–4022.

13. Gorham ED, Garland FC, Garland CF. Sunlight and breast cancer incidence in the USSR. *Int J Epidemiol* 1990; 19(4): 820–824.
14. Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Stone BJ. Geographic patterns of breast cancer in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59(5): 1407–1411.
15. Chen W, Clements M, Rahman B et al. Relationship between cancer mortality/incidence and ambient ultraviolet B irradiance in China. *Cancer Causes Control* 2010; 21(10): 1701–1709. doi: 10.1007/s10552-010-9599-1.
16. Ross C, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB (eds). *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D* [monograph on the Internet]. Washington: National Academies Press (US); 2011 [cited 2014 February]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56070/>.
17. Eitenmiller RR, Ye L, Landen WO Jr (eds). *Vitamin analysis for the health and food sciences*. 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press 2008.
18. Shin MH, Holmes MD, Hankinson SE et al. Intake of dairy products, calcium and vitamin D and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(17): 1301–1311.
19. Lin J, Manson JE, Lee IM et al. Intakes of calcium and vitamin D and breast cancer risk in women. *Arch Intern Med* 2007; 167(10): 1050–1059.
20. McCullough ML, Rodriguez C, Diver WR et al. Dairy, calcium and vitamin d intake and postmenopausal breast cancer risk in the cancer prevention study II nutrition cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(12): 2898–2904.
21. Robien K, Cutler GJ, Lazovich D. Vitamin D intake and breast cancer risk in postmenopausal women: the Iowa women's health study. *Cancer Causes Control* 2007; 18(7): 775–782.
22. Sperati F, Vici P, Maugeri-Saccà M et al. Vitamin D supplementation and breast cancer prevention: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One* 2013; 8(7): e69269. doi: 10.1371/journal.pone.0069269.
23. Mohr SB, Gorham E, Alcaraz JE et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *Anticancer Res* 2011; 31(9): 2939–2948.
24. Fedirko V, Torres-Mejía G, Ortega-Olvera C et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: results of a large population-based case-control study in Mexican women. *Cancer Causes Control* 2012; 23(7): 1149–1162. doi: 10.1007/s10552-012-9984-z.
25. Yin L, Grandi N, Raum E et al. Meta-analysis: serum vitamin D and breast cancer risk. *Eur J Cancer* 2010; 46(12): 2196–2205. doi: 10.1016/j.ejca.2010.03.037.
26. Drábová K, Bienertová-Vašková J, Lokaj P et al. Vitamin D – jeho fyziologie, patofyziologie a význam v etiopatogenezi nádorových onemocnění. *Čas Lék Čes* 2013; 152(1): 20–30.
27. Blackmore KM, Lesosky M, Barnett H et al. Vitamin D from dietary intake and sunlight exposure and the risk of hormone-receptor-defined breast cancer. *Am J Epidemiol* 2008; 168(8): 915–924. doi: 10.1093/aje/kwn198.
28. Neuhauser ML, Sorensen B, Hollis BW et al. Vitamin insufficiency in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(1): 133–139.
29. Anzano MA, Smith JM, Uskokovic MR et al. 1- α ,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-26,27-hexafluorocholecalciferol, a new delanoid (vitamin D analog) for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer Res* 1994; 54(7): 1653–1656.
30. Deeb K, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Rev Cancer* 2007; 7(9): 684–700.
31. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D et al. Repression of smoothened by patched-dependent (pro)-vitaminD3 secretion. *PLoS Biol* 2006; 4(8): e232.
32. Tang JY, Xiao TZ, Oda Y et al. Vitamin D3 inhibits hedgehog signaling and proliferation in murine Basal cell carcinomas. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4(5): 744–751.
33. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI et al. Vitamin D deficiency is common at breast cancer diagnosis and is associated with significantly higher risk of distant recurrence and death in a prospective cohort study of T1-3, N0-1, M0 breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26 (Suppl): 9.
34. Crew KD, Gammon MD, Steck SE et al. Association between plasma 25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2(6): 598–604. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0138.
35. Vieth R, Chan PC, MacFarlane GD. Efficacy and safety of vitamin D3 intake exceeding the lowest observed adverse effect level. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2): 288–294.
36. Hathcock JN, Shao A, Vieth R et al. Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(1): 6–18.
37. Khan QJ, Reddy PS, Kimler BF et al. Effect of vitamin D supplementation on serum 25-hydroxy vitamin D levels, joint pain, and fatigue in women starting adjuvant letrozole treatment for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119(11): 111–118. doi: 10.1007/s10549-009-0495-x.
38. Amir E, Simmons CE, Freedman OC et al. A phase 2 trial exploring the effects of high-dose (10,000 IU/day) vitamin D3 in breast cancer patients with bone metastases. *Cancer* 2010; 116(2): 284–291. doi: 10.1002/cncr.24749.
39. Abbas S, Linseisen J, Slinger T et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer—results of a large case-control study. *Carcinogenesis* 2008; 29(1): 93–99.
40. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(16): 5367–5374.
41. Rainville CH, Khan Y, Tisman G. Triple negative breast cancer patients presenting with low serum vitamin D levels: a case series. *Cases J* 2009; 2: 8390. doi: 10.4076/1757-1626-2-8390.
42. Carey LA, Perou CM, Livasy CA et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA* 2006; 295(1): 2492–2502.
43. Laporta E, Welsh J. Modeling vitamin D actions in triple negative/basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. In press 2013. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.10.022.
44. Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM et al. Vitamin D-3 receptor as target for breast cancer prevention. *J Nutr* 2003; 133 (Suppl 7): 2425S–2433S.
45. Köstner K, Denzer N, Müller CS et al. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res* 2009; 29(9): 3511–3536.
46. McKay JD, McCullough ML, Ziegler RG et al. Vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk: results from the National cancer institute breast and prostate cancer cohort consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(1): 297–305. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0539.
47. Sinotte M, Rousseau F, Ayotte P et al. Vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI) and breast cancer risk: association replication in two case-control studies within French Canadian population. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15(4): 975–983. doi: 10.1677/ERC-08-0056.
48. Wang H, Wang W, Yang D et al. TaqI polymorphism of VDR gene contributes to breast cancer risk. *Tumour Biol* 2014; 35(1): 93–102. doi: 10.1007/s13277-013-1011-9.
49. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2007; 167(16): 1730–1737.
50. Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(22): 1581–1591. doi: 10.1093/jnci/djn360.
51. Wactawski-Wende J, Morley Kotchen J, Anderson GL et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Eng J Med* 2006; 354(7): 684–696.

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Časopis České onkologické společnosti a Slovenskej onkologickej spoločnosti
The Journal of the Czech and Slovak Oncological Societies

REDAKČNÍ RADA

Výkonná redakční rada (Brno)

vedoucí redaktor

doc. MUDr. Vuk Fait, CSc.

MUDr. Petr Čoupek
doc. MUDr. Lenka Foretová, Ph.D.
prof. MUDr. Roman Hájek, CSc.

výkonný redaktor

doc. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

MUDr. Ivo Kocák, Ph.D.
MUDr. Jiří Novák
prof. MUDr. Aleš Rejthar, CSc.

doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.
prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc., dr. h. c.

Širší redakční rada

prof. MUDr. Zdeněk Adam, CSc., Brno
MUDr. Otakar Bednařík, Brno
doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D., Praha
prof. MUDr. David Cibula, CSc., Praha
MUDr. Karel Cwiertka, Ph.D., Olomouc
doc. MUDr. Ladislav Dušek, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc., Praha
doc. MUDr. David Feltl, Ph.D., Ostrava
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Olomouc
prof. MUDr. Ľudovít Jurga, DrSc., Trnava
doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc., Bratislava
prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., Praha
prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc., Bratislava

doc. MUDr. Jozef Mardiak, CSc., Bratislava
prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc., Brno
doc. MUDr. Michal Mego, Ph.D., Bratislava
prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D., Olomouc
doc. MUDr. Beata Mladosičová, CSc., Bratislava
MUDr. Rudolf Nenutil, CSc., Brno
doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D., Praha
prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc., Bratislava
doc. RNDr. Martina Ondrušová, Ph.D., Bratislava
prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., Praha
prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D., Brno
doc. MUDr. Luděk Pour, Ph.D., Brno
doc. MUDr. Igor Puzanov, Nashville

prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc., Praha
prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc., Praha
prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D., Hradec Králové
prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc., Brno
prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D., Brno
MUDr. Tomáš Svoboda, Ph.D., Plzeň
MUDr. Tomáš Šálek, Bratislava
prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D., Brno
doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Anna Vašků, CSc., Brno
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc., Brno
doc. MUDr. Mária Wagnerová, CSc., Košice
prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc., Brno

Čestní členové redakční rady

prof. MUDr. Josef Bilder, CSc., Brno
prof. Sándor Eckhardt, Budapešť
prof. Jan Klusterský, Brusel

prof. MUDr. Josef Koutecký, DrSc., Praha
prof. RNDr. Jan Kovařík, DrSc., Brno
prof. MUDr. Zdeněk Mechl, CSc., Brno

MUDr. Jaroslav Němec, CSc., Brno
doc. MUDr. Ivan Pleško, DrSc., Bratislava
MUDr. Viliam Ujházy, DrSc., Bratislava

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2014

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně.

Registrační značka MK ČR 5158. ISSN 0862-495X. ISSN pro on-line přístup 1802-5307.

On-line verze je přístupná na adrese www.linkos.cz nebo www.klinickaonkologie.cz.

Časopis Klinická onkologie je uveden na Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR, schváleném Radou pro výzkum a vývoj vlády ČR.

Nakladatel: Ambit Media, a.s., Klicperova 604/8, 150 00 Praha 5-Smíchov, tel./fax: +420 222 352 573/572.

Odpovědná redaktorka: Mgr. Simona Nováková, e-mail: simona.novakova@ambitmedia.cz.

Adresa redakce: Ambit Media, a.s., Media Hall, Bidláky 20, 639 00 Brno.

Grafická úprava: Karel Zlevor. Jazyková korektura: Mgr. Alena Šmídová

Vychází 6krát ročně. Předplatné na rok 2014 činí 540 Kč (22 eur).

Informace o předplatném podává a objednávky předplatitelů přijímá: e-mail: predplatne@ambitmedia.cz.

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá: Mgr. Blanka Turínová, e-mail: blanka.turinova@ambitmedia.cz, tel.: +420 724 811 983.

Rukopisy vkládejte do redakčního systému: <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>; případné dotazy směřujte na mail klinickaonkologie@mou.cz

Redakce časopisu Klinická onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, e-mail: klinickaonkologie@mou.cz.

Pokyny pro autory naleznete na www.linkos.cz v sekci časopisu nebo na www.klinickaonkologie.cz.

Toto číslo vychází 15. 6. 2014.

Redakce časopisu **Klinická onkologie** vypisuje

SOUTĚŽ O NEJLEPŠÍ PRÁCI

v kategoriích:

- Původní práce
- Přehled
- Kazuistika

Podmínky soutěže:

1. Do soutěže budou automaticky zařazeny všechny práce publikované v roce 2014.
2. Práce budou hodnoceny členy redakční rady.
3. Hlavními kritérii hodnocení budou odborná úroveň, originalita a přínos zveřejněných údajů.
4. Výsledky soutěže budou vyhlášeny v časopise Klinická onkologie 1/2015.

Nejlepší práce z každé kategorie bude oceněna částkou 10 000 Kč.

Instrukce pro autory naleznete na internetových stránkách České onkologické společnosti ČLS JEP www.linkos.cz nebo na stránkách www.klinickaonkologie.cz.
Dotazy můžete zasílat na adresu klinickaonkologie@mou.cz a své příspěvky vkládat do redakčního systému časopisu Klinická onkologie <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>.

Proč publikovat v časopise Klinická onkologie?

Vaše práce budou dohledatelné ve 4 renomovaných světových bibliografických databázích MEDLINE/PubMed, EMBASE/Excerpta Medica, SCOPUS, Index Copernicus a tuzemské databázi Bibliographia medica chechoslovaca.

Vaše práce budou uznávány při hodnocení grantů, pro obhajoby doktorského studia a pro habitační a profesorské řízení.

Vaše práce budou čteny. Časopis Klinická onkologie patří k nejčtenějším onkologickým časopisům!

Partner:

AstraZeneca 

We take cancer personally

