

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



Sledování genetických faktorů ovlivňujících riziko vzniku a průběh karcinomů kolorekta a pankreatu.

Study of genetic factors modifying the risk of onset and progression of colorectal and pancreatic cancer

Beatrice Mohelníková Duchoňová

Praha, 2012

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Preventivní medicína

Předseda oborové rady: Doc. MUDr. Alexander Čelko, CSc.

Školící pracoviště: Laboratoře toxikogenomiky

Státní zdravotní ústav v Praze

Šrobárova 48, 100 42 Praha10

Školitel: RNDr. Pavel Souček, CSc.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah:

Abstrakt	3
Abstract	5
1. Úvod	7
2. Hypotézy a cíle práce	11
3. Materiál a metodika.....	14
4. Výsledky a diskuze.....	17
5. Závěry.....	28
6. Použitá literatura	31
<i>Seznam publikací doktoranda:</i>	<i>37</i>

Abstrakt

Úvod: Cílem této práce bylo sledování genetických faktorů ovlivňujících riziko vzniku a průběh karcinomů kolorekta a pankreatu. První část se zabývá etiologickými faktory, a to vlivem polymorfismů v biotransformačních enzymech a genetických alterací v genu *CHEK2* na vznik těchto malignit. V druhé části jsou analyzovány geny transportu cytostatik jako případné prognostické a prediktivní markery odpovědi na onkologickou léčbu. **Materiály a metody:** Polymorfismy a další genetické alterace byly zjišťovány pomocí real-time PCR, alel-specifické PCR a PCR-RFLP metody v DNA získané z krve pacientů. Byla hodnocena frekvence polymorfismů a posuzován jejich význam s ohledem na dostupná epidemiologická data. Expresí genů byly stanoveny metodou qPCR v párových vzorcích tkání nádoru a okolního parenchymu. **Výsledky:** Pro většinu námi sledovaných polymorfismů se nepodařilo prokázat vztah mezi jejich přítomností a rizikem vzniku obou těchto malignit. Variantní alela *CYP2A13*7*, byla nalezena u 7 z 265 hodnocených zdravých kontrol, ale nebyla nalezena u žádného pacienta s karcinomem pankreatu. Výskyt variantní alely *GSTP1-Val* a genotypu *GSTT1-null* byl naopak spojen se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu pankreatu (OR=2,38; 95% CI=1,17- 4,83). V souboru pacientů s kolorektálním karcinomem byl genotyp *GSTT1-null* v kombinaci s *GSTM1-null* genotypem spojen s mírně zvýšeným rizikem (OR=1,58; 95% CI=1,01-2,47) a samotná delece *GSTM1* zvyšovala riziko kolorektálního karcinomu po zohlednění ostatních sledovaných faktorů (OR=1,30; 95% CI=1,01-1,68). Porovnáním exprese všech 49 členů lidské nadrodiny ABC transportérů u vzorků nádoru

pankreatu s okolní nenádorovou tkání pankreatu jsme zjistili, že 11 genů bylo statisticky významně upregulováno a 4 downregulovány ($p < 0,05$) v tkáni adenokarcinomu. Zjištěná zvýšená exprese *ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB4*, *ABCC1*, *ABCC5* v nádorové tkáni je ve shodě s jejich dříve prokázaným fenotypem mnohočetné lékové rezistence. Downregulace *ABCA3* ($p = 0,002$), *ABCA5* ($p = 0,010$), *ABCC6* ($p < 0,001$) a *ABCC7* ($p = 0,016$) ve tkáni karcinomu pankreatu zatím nebyla publikována. **Závěry:** Naše výsledky ukazují, že polymorfismy v genech kódující biotransformační enzymy mohou ovlivňovat riziko vzniku maligního onemocnění slinivky břišní a tlustého střeva v české populaci. Výsledky pilotní studie zaměřené na expresi ABC transportérů ve tkáni karcinomu pankreatu prokázaly významné rozdíly v hladinách transkriptů těchto membránových enzymů, které jsou klíčové pro transport cytostatik ven z nádorových buněk. Pro potvrzení těchto výsledků jsou však nutné ověřující analýzy na větších souborech pacientů.

Abstract

Introduction: The aim of this study was to evaluate the role of genetic and lifestyle factors in the risk of onset and progression of colorectal and pancreatic cancer. The first part deals with the etiological factors and the importance of polymorphisms in biotransformation enzymes and genetic alterations in the gene *CHEK2* in the origin of these malignancies. In the second part, the ABC transporter genes were analyzed as potential prognostic and predictive markers of a treatment's outcome. **Materials and methods:** The polymorphisms and other genetic alterations were detected using real-time PCR, allele-specific PCR and PCR-RFLP methods in DNA which was extracted from the blood of patients. The frequency of polymorphisms was evaluated and their importance was assessed with regard to the available epidemiological data. Gene expressions were determined by qPCR in paired samples of tumor tissue and adjacent non-tumorous parenchyma. **Results:** A majority of the observed polymorphisms failed to show a relationship between their presence and the risk of any of these malignancies. *CYP2A13* variant allele*7 coding inactive enzyme was found in 7 of 265 controls and in none of 235 pancreatic carcinoma patients. In contrast, *GSTP1*-codon 105 Val variant allele and *GSTT1-null* genotype were associated with an elevated pancreatic cancer risk (OR=1.38; 95%CI=0.96-1.97 and OR=1.56; 95%CI=0.93-2.61, respectively). A combination of *GSTT1-null* and *GSTP1*-codon 105 Val variants further increased the risk of pancreatic cancer (OR=2.50; 95%CI=1.20-5.20). In the group of patients with colorectal cancer, the *GSTT1-null* genotype in combination with the *GSTM1-null* genotype was associated

with a slightly increased risk (OR=1.58, 95% CI=1.01-2.47) and the actual deletion of *GSTM1* increased the risk of colorectal cancer after adjusting for other observed factors (OR=1.30, 95% CI=1.01-1.68). By comparing the expression levels of all 49 members of the human ABC transporters in pancreatic tumor samples with nonmalignant pancreatic tissue, we found that 11 genes were significantly upregulated and 4 genes downregulated ($p < 0.05$) in adenocarcinoma tissue. The observed increased expression of *ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB4*, *ABCC1*, *ABCC5* in tumor tissue is consistent with their previously demonstrated multidrug resistance phenotype. Downregulation of *ABCA3* ($p = 0.002$), *ABCA5* ($p = 0.010$), *ABCC6* ($p < 0.001$) and *ABCC7* ($p = 0.016$) in pancreatic cancer tissue has not yet been published. **Conclusions:** Our results indicate that polymorphisms in genes coding for biotransformation enzymes may influence the risk of malignant disease of the pancreas and colon in the Czech population. The results of the pilot study on the expressions of ABC transporters in pancreatic cancer tissues showed significant differences in transcript levels of these membrane proteins that are crucial for the transport of chemotherapeutic agents outside of tumor cells. However, analyses on larger sets of patients are necessary to verify and confirm these results.

1. Úvod

Kolorektální karcinom je celosvětově třetím nejčastěji diagnostikovaným zhoubným nádorem. Česká republika se v rámci incidence CRC řadí na druhou příčku v Evropě [1]. Karcinom pankreatu je jednou z nejzávažnějších forem nádorového onemocnění. V ČR je čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění [2]. Navzdory závažnosti těchto malignit a špatné prognóze, spojené zejména s karcinomem pankreatu, není jejich etiologie a molekulární patogeneze stále objasněna.

V etiologii sporadického karcinomu kolorekta je stále častěji zmiňován způsob výživy. Maso a jeho nevhodná příprava, spolu se sníženým příjmem ovoce a zeleniny bývají uváděny mezi možnými rizikovými faktory. Důvodem tohoto zvýšeného rizika bývají nejčastěji považovány karcinogeny, které vznikají při vysokých teplotách úpravy masa (grilování, smažení), a to polycyklické aromatické uhlovodíky a heterocyklické aminy [3]. Tyto sloučeniny jsou i součástí cigaretového kouře, který je také potenciálním rizikovým faktorem vzniku kolorektálního karcinomu [4]. Publikované rizikové faktory u karcinomu pankreatu jsou věk, pohlaví, diabetes, chronická pankreatitida, dietní návyky, kouření a infekce *Helicobacter pylori* [3, 4, 5].

Metabolismus cizorodých látek vyskytujících se v životním prostředí člověka, a to jak aktivace prokarcinogenů, tak odbourávání karcinogenů v organismu, může rovněž hrát důležitou roli při vzniku a rozvoji obou malignit. Polymorfismy v genech kódujících biotransformační enzymy tedy mohou ovlivňovat riziko vzniku nádorového onemocnění u jednotlivce [6]

V literatuře se uvádí, že pouze kolem 6% kolorektálních karcinomů a 4-16% karcinomů pankreatu patří k tzv. familiární formě, kdy jsou nalezeny zárodečné mutace v genech s vysokou penetrancí [7,8]. Daleko větší podíl na genetické predispozici k nádorovým onemocněním mají pravděpodobně kombinace alterací genů s nízkou penetrancí [9,10]. Jedním z intenzivně studovaných genů s nízkou penetrancí je *CHEK2* (checkpoint kinase 2) označovaný někdy také jako *CHK2*. Tento gen kóduje proteinkinázu aktivovanou v odpovědi na poškození genomové DNA. [11].

Prognóza a terapie kolorektálního karcinomu značně závisí na stádiu, ve kterém byla nemoc zjištěna. Zatímco po radikálním odstranění tumoru u počátečních stádií je pětileté přežití vyšší než 80%, u metastatické formy je průměrná doba přežití 11 měsíců. Prognóza karcinomu pankreatu je vzhledem k mortalitě rovnající se incidenci infaustní. Chemoterapii pokročilého karcinomu pankreatu je dosahováno mediánu přežití jen kolem 5-8 měsíců [12]. Jediným dnes potenciálně kurativním přístupem je radikální resekce. V adjuvantní i paliativní chemoterapii se uplatňují u obou nádorů zejména nukleotidová analoga, jako 5-fluorouracil u kolorekta, nebo gemcitabin u pankreatu

Biotransformační enzymy

Biotransformační enzymy obvykle konvertují xenobiotika rozpustná v tucích na látky rozpustné ve vodě a usnadňují tak jejich vylučování z organismu. Biotransformace se skládá ze tří kroků: 1. fáze (aktivace), 2. fáze (konjugace) a 3. fáze (transport). Hlavními enzymy 1. fáze biotransformace jsou cytochromy P450 a další enzymy jako NAD(P)H:chinon oxidoreduktázy, které katalyzují aktivační reakce, při kterých

vznikají reaktivní meziprodukty. Tyto elektrofilní meziprodukty poté snadno konjugují s nukleofilními molekulami jako je např. glutation v reakcích 2. fáze biotransformace. Většina těchto konjugovaných produktů je poté pumpována vně buněk pomocí membránových ABC transportérů- 3. fáze biotransformace [13].

Biotransformační enzymy se tak velkou mírou podílejí na ochraně buněk před poškozením volnými radikály a karcinogeny, a z tohoto důvodu jsme v další studii sledovali význam jejich polymorfismů na rozvoj nádorových onemocnění.

Jedním z nejdůležitějších mechanismů chemorezistence je snížená akumulace léčiva v nádorových buňkách díky jeho zvýšenému úniku (efflux). Ten je zprostředkován zejména proteiny, které z velké části přísluší k nadrodině ABC transportérů (human ATP-binding cassette transporters). K dnešnímu datu bylo v lidském genomu identifikováno 49 různých ABC transportérů [14]. U čtrnácti ABC transportérů byla prokázána schopnost navodit chemorezistenci v nádorových buňkách [15].

Nukleotidová analoga, která jsou v současnosti nejvíce využívána v terapii karcinomu kolorekta a pankreatu, jsou transportována do buněk zejména nukleosidovými transportéry. Zatím je známo 7 nukleosidových transportérů, které se dělí do dvou rodin proteinů: SLC29 a SLC28 [16, 17]. Současný výzkum prokázal, že buňky, které nejsou schopny transportu pomocí těchto proteinů, jsou k inhibici nukleotidovými analogy významně rezistentní [18].

Je tedy téměř jisté, že transmembránové proteiny rodiny ABC a SLC jsou klíčové pro úspěšnost a výsledky chemoterapie. Další studie individuálních rozdílů v genotypu a

fenotypu těchto transportérů jsou zapotřebí k definování léčebných modalit, jako např. dávkování a nejvhodnější kombinace chemoterapeutik pro každého pacienta (individualizovaná terapie), a tak k dosažení lepších výsledků v protinádorové léčbě.

Specifika studia genových expresí u karcinomu pankreatu

Genové expresní profilování poskytuje důležité informace o molekulárních a biologických charakteristikách nádorů a je hojně využíváno při objevování nádorových biomarkerů [19]. Nicméně v případě karcinomu pankreatu je sledování míry exprese jednotlivých genů spojeno s výraznějšími problémy ve srovnání s jinými typy karcinomů.

Kromě velkých zahraničních center, musí být obvykle do studie zapojeno více chirurgických pracovišť, aby bylo možno získat dostatečné množství vzorků ke studiu. Dalším problémem u karcinomu pankreatu je jeho histologická charakteristika- nízké zastoupení nádorových buněk v poměru k výraznému okolnímu vazivovému stromatu. Pro úspěšnou analýzu je zásadní získání RNA dostatečné kvality a kvantity [20]. Tkáň slinivky břišní však obsahuje obrovské množství endogenních ribonukleáz, které jsou produktem normálních acinárních buněk pankreatu a tedy i nedílnou součástí pankreatické šťávy. RNAázy způsobují rozsáhlou degradaci RNA v pankreatické tkáni a velmi komplikují izolaci a další zpracování RNA.

Z výše uvedených důvodů se ještě před deseti lety předpokládalo, že nelze stanovit expresní profily u tkáni pankreatu stejně jako u jeho nádorů. Nicméně tyto problémy se postupně daří překonávat a expresní analýzy u karcinomu pankreatu v současnosti probíhají na řadě pracovišť.

2. Hypotézy a cíle práce

Hlavním úkolem tohoto projektu bylo prostudovat vztahy mezi polymorfismy v genech metabolismu složek cigaretového kouře a alkoholu, jmenovitě *CYP2A13*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *ADH1B* a *ADH1C* a rizikem vzniku dvou nejvýznamnějších gastroenterologických nádorů z hlediska mortality - karcinomu kolorekta a pankreatu. Z mnoha výše zmíněných studií vyplývá vliv polymorfismů v genech pro biotransformační enzymy na riziko vzniku nádorového onemocnění u jejich nosičů. Vzhledem ke známým rizikovým faktorům jako je alkohol a kouření u rakoviny pankreatu zůstává otázkou, do jaké míry je vnímavost jedince k těmto látkám dána jeho genetickou výbavou, a jakou mírou se podílí složky vnějšího prostředí. Výskyt polymorfismů i životní styl v rámci různých populací se však může významně lišit a není známo jak tyto rozdíly riziko vzniku nádorů ovlivňují. Projekt měl za cíl ověřit hypotézu, zda alely kódující funkčně alterované biotransformační enzymy, které se podílejí na aktivaci prokarcinogenů, mají významnou úlohu pro vznik nádoru pankreatu a kolorektav naší populaci, resp. zda je jejich výskyt u pacientů s nádory pankreatu odlišný od skupiny kontrolních osob bez nádorového onemocnění. V průběhu metabolismu, jak endogenních, tak i exogenních substrátů (např. tabákový kouř, etanol) vznikají v buňkách těla produkty se silnými biologickými účinky, tzv. volné radikály. Proto bylo cílem sledovat i vliv polymorfismů v genech kódující enzymy zapojené v metabolismu volných radikálů a oxidativního stresu, jako jsou *SOD2*, *SOD3*, *NQO1* a *NQO2*, a jejich významu pro vznik nádoru pankreatu a kolorekta.

V literatuře se uvádí, že pouze kolem 6% kolorektálních karcinomů a 4-16% karcinomů pankreatu patří k tzv. familiární formě, kdy jsou nalezeny zárodečné mutace v genech s vysokou penetrancí. Daleko větší podíl na genetické predispozici k nádorovým onemocněním mají pravděpodobně kombinace alterací genů s nízkou penetrancí. Jedním z intenzivně studovaných genů s nízkou penetrancí je *CHEK2* (checkpoint kinase 2) označovaný někdy také jako *CHK2*. V genu *CHEK2* bylo doposud popsáno několik inaktivujících mutací v souvislosti se vznikem jak hereditárních nádorových syndromů (Li-Fraumeni syndrom), tak i sporadických maligních nádorů (karcinom prsu, prostaty, štítné žlázy, osteosarkomu, apod.). Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda existuje vztah mezi vybranými funkčně významnými genetickými alteracemi *CHEK2* a rizikem vzniku kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu.

Rizikové faktory nádorových onemocnění jsou známy již řadu let, stejně jako nutnost vrozené vnímavosti jedince k jejich uplatnění v procesu vzniku nádorového onemocnění. Tato práce by mohla přispět k objasnění etiologie a molekulární patogeneze karcinomu pankreatu a kolorektálního karcinomu, zejména co se týče ovlivnění vnímavosti jedince k noxám vnějšího prostředí (gene-environmental interaction). Případný objev zákonitostí by měl najít uplatnění v identifikaci rizikových skupin, na něž by bylo vhodné zaměřit primární prevenci formou úpravy životního stylu či chemoprevence. Rovněž sekundární prevence cílená k nalezení onemocnění v časných stádiích by zejména u pankreatu měla zcela zásadní význam pro úspěšnost jeho léčby.

Další hypotéza byla postavena na faktu, že pacienti s nádory odpovídají rozdílně na podanou chemoterapii. V řadě modelových systémů byly identifikovány geny interagující s účinkem cytostatik používaných pro léčbu karcinomu pankreatu. Rozdílné exprese těchto genů by tedy měly být jedním z důvodů pro vznik rezistence vůči chemoterapii. Studovanými geny byly zejména ABC transportéry. Záměrem této části studia bylo zjistit, zda jsou tkáně odebrané od pacientů s karcinomem slinivky vhodné pro expresní studie, a zda existují rozdíly v expresních profilech genů transportu cytostatik mezi tkáněmi nádorů a okolního nenádorového parenchymu, které by bylo možné využít pro hodnocení rozdílů mezi pacienty dobře odpovídajícími na léčbu (sensitivní) a těmi, co odpovídají minimálně, či vůbec (rezistentní). Změny v expresi genů podílejících se na transportu a metabolismu cytostatik podle dosavadních zkušeností mohou významně ovlivňovat výsledky léčby, a zejména v případě karcinomu pankreatu zatím existuje jen málo prací týkajících se této problematiky. Z literatury je spíše znám vliv řady genů na transformaci cytostatik studovaných na různých buněčných či zvířecích modelech. Současně ovšem je velmi málo prozkoumán význam těchto genů v dlouhodobém kontextu komplexní onkologické a onkochirurgické léčby indikované v moderních schématech (dle empirických zkušeností onkologů bez ohledu na farmakogenomiku). Racionalizace onkologické léčby je v současné době žádána i z důvodu omezených finančních zdrojů. Získané výsledky by tedy mohly ovlivnit znalosti a zkušenosti s indikací této léčby.

3. Materiál a metodika

Biologický materiál

Pro izolaci DNA z periferních lymfocytů byly použity vzorky venózní krve pacientů získané během standardních vyšetřovacích postupů pro danou diagnózu. Během let 2003 - 2010 byla postupně získána DNA z periferní krve 298 pacientů s diagnózou nádorového onemocnění slinivky břišní, 495 pacientů s kolorektálním karcinomem a 683 zdravých kontrol bez onkologického onemocnění. Všichni účastníci studií podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí 1. LF UK v Praze. Z lékařské dokumentace byly ke vzorkům doplněny základní klinické a patologické informace. Všichni pacienti vyplnili s ošetřujícím lékařem osobní dotazník týkající se základních epidemiologických rizikových faktorů diskutovaných v souvislosti s typem nádoru.

Během let 2008-2010 byly získány vzorky tkání od 37 pacientů s podezřením na karcinom slinivky, kteří podstoupili chirurgickou léčbu na Klinice transplantační chirurgie IKEM v Praze. Z této skupiny bylo pro pilotní studii vybráno 10 pacientů s histologicky verifikovaným adenokarcinomem hlavy pankreatu. U všech vzorků byly získány následující informace: pohlaví a věk pacientů, datum diagnózy, typ nádorů, stav okolní nenádorové tkáně, lokalizace, rozsah a velikost nádorů, stupeň diferenciacce, přítomnost eventuální angioinvaze, počet postižených uzlin, typ a radikalita resekce. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí při Thomayerově fakultní nemocnici a IKEM.

Izolace nukleových kyselin

Izolace DNA z periferních lymfocytů byla prováděná pomocí fenol-chloroformové extrakce a pomocí magnetických partikulí s využitím přístroje „KingFisher“ (Thermo electron corporation, Vantaa, Finsko) a kitu BioSprint™. Izolace RNA z tkání byla prováděna pomocí Trizolu (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). K měření koncentrace celkové RNA byla využita fluorescenční metoda za využití Quant-iT™ RNA Assay Kitu (Invitrogen, Carlsbad, CA) a čtečky mikrodestiček Infinite M200 (Tecan, Vienna, Austria). K ověření kvality RNA bylo využito metody stanovení tzv. RNA Integrity Number (RIN) na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) s využitím RNA Nano 6000 LabChip kitu (Agilent Technologies). Koncentrace a čistota DNA byla měřena na spektrofotometru Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) a ověřena metodou za využití Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kitu (Invitrogen, Carlsbad, CA) a Infinite M200 (Tecan, Vienna, Austria).

Stanovení polymorfismů v genech kódující biotransformační enzymy

V této práci bylo ke genotypování využito dvou metod. Polymorfismy v genech *EPHX1*, *GSTP1*, *CYP2A13*, *ADH1B*, *ADH1C*, *SOD2*, *SOD3*, *NQO1*, *NQO2* byly stanoveny pomocí real-time polymerázové řetězové reakce na přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australie) s využitím fluorescenčně značených sond TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). Druhou metodou byla klasická polymerázová řetězová reakce (PCR) s následnou analýzou

délky restričních fragmentů a alel-specifické PCR (*GSTM1*, *GSTT1* a *GSTP1*).

Stanovení mutací v genu CHEK2

Genetické alterace v FHA doméně (fork head-associated domain) kódující exony 2 a 3 spolu s introny 1 - 3 a mutace 1100delC byly stanoveny pomocí denaturační vysokotlaké kapalinové chromatografie spolupracujícím pracovištěm (Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK, Praha). Nalezené alterace byly potvrzeny pomocí sekvenace DNA z nezávislých PCR produktů. Přítomnost rozsáhlé genomické delece 5395 bp v exonech 8 a 9 byla analyzována PCR metodou.

Relativní kvantifikace míry exprese genů pomocí real-time PCR

Před samotnou relativní kvantifikací genové exprese transportérů byly vybrány vhodné referenční geny pro námi sledované malignity a skupiny pacientů. qPCR byla stanovena pomocí přístroje 7500 Real-Time PCR System s pomocí TaqMan® Custom Plates (Applied Biosystems). K vyhodnocení stability jednotlivých referenčních genů byly poté využity programy: NormFinder verze 19 (2009) a geNorm verze 3.5 (2007). Jako referenční geny pro karcinom pankreatu byly zvoleny geny *MRPL19*, *EIF1*, *POLR2A*. Ke stanovení relativní kvantifikace exprese genů ABC a SLC transportérů byly použity sondy TaqMan® Gene Expression Assays. qPCR probíhalo na přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). K hodnocení míry exprese sledovaných transportérů byl použit program REST 2009 (Qiagen).

4. Výsledky a diskuze

Význam polymorfismů v biotransformačních enzymech a alterací v genu CHEK2 pro individuální vnímavost ke karcinomu pankreatu

V naší studii jsme potvrdili významný efekt většiny dříve publikovaných rizikových faktorů pro vznik karcinomu pankreatu (věk, pohlaví, chronická pankreatitida, diabetes). Nepozorovali jsme efekt kouření, alkoholu a pití kávy na riziko vzniku tohoto onemocnění, ale jedinci, kteří pili více jak 3 šálky čaje, měli riziko vzniku nádoru pankreatu významně nižší než ostatní. Tyto výsledky potvrdily předchozí polskou studii, kde byl nalezen obdobný trend nižšího rizika vzniku nádoru slinivky ve vztahu k délce pravidelného pití čaje ($p > 0,001$; [21]), ale jsou v rozporu s japonskou studií, kde se pití čaje jako rizikový faktor nepotvrdil [22]. Diskrepance v těchto výsledcích může být spojena s rozdíly v kvalitě a druhu čaje, stejně jako v designu studie.

V našem souboru byla nalezena prevalence variantní *CYP2A13* alely, způsobující předčasnou zástavu translace v kodonu 101 (knockout allele*7), v kontrolní skupině. Vzhledem k tomu, že nebyl nalezen ani jeden nosič této variantní alely u pacientů s karcinomem pankreatu, nemohla být tato závislost statisticky vyjádřena. Nicméně, s přihlédnutím k pilotní studii P450 2A13 u respiračního traktu [23] a faktu, že takto pozměněný protein ztrácí svou enzymatickou aktivitu v metabolické bioaktivaci prokarcinogenů tabákového kouře (a pravděpodobně i dalších environmentálních kontaminant), se naše výsledky jeví jako vysoce relevantní.

Vzhledem k výskytu v pankreatické tkáni se alkoholdehydrogenáza (ADH) stala atraktivním cílem pro další studium etiologie karcinomu pankreatu. Role alkoholu při vzniku nádorů pankreatu je v současnosti poměrně kontroverzní [24,25]. Genkinger et al. [26] provedli analýzu dat ze 14 prospektivních kohortových studií a získali tak soubor 862 664 jedinců, z nichž 2 187 tvořily sporadické případy karcinomu pankreatu. Závěrem studie je, že existuje mírně vyšší riziko karcinomu pankreatu u osob konzumujících více jak 30g alkoholu denně (RR=1,22; 95% CI=1,03-1,45). Nicméně v našem souboru jsme nenalezli ani vztah k abusu alkoholu, ani k polymorfismům v genech *ADH1B* a *ADH1C*, jejichž enzymové produkty metabolizují etanol.

Přestože byl *GSTM1*-null genotyp uveden jako potenciální rizikový faktor pro bronchogenní karcinom [27], podle našich výsledků není pravděpodobné, že významně ovlivňuje riziko karcinomu pankreatu. Náš nález na české populaci se shoduje s výsledky amerických pracovišť [28,29].

V této studii variantní alela *Val* v kodónu 105 *GSTP1* významně zvýšila riziko vzniku karcinomu pankreatu (3,09-krát) u jedinců mladších než 50 let. Role polymorfismů *GSTP1* v patogenezi tohoto typu nádoru byla popsána i dalšími pracovišti [28], přestože na rozdíl od našich výsledků Jiao et al. našli vztah naopak u jedinců starších 62 let. Rozpor ve výsledcích obou studií může být způsoben sledováním malých souborů pacientů, příspěvkem dalších genů a/nebo genotypů, odlišným životním stylem populací nebo rozdílným designem obou studií.

Oxidativní stres hraje důležitou roli v patologických stavech tkání včetně zánětu a karcinogeneze [30]. Experimentálně bylo prokázáno, že cigaretový kouř vede

k zánětu pankreatu, tj. pankreatitidě [31] právě zvýšením oxidativního stresu buněk [32]. Navíc se zdá, že dysfunkce A-buněk pankreatu u diabetu 2. typu vzniká rovněž působením volných radikálů [33].

Genetické polymorfismy kódující superoxid dismutázy a chinon oxidoreduktázy s poškozenou enzymatickou aktivitou a/nebo stabilitou byly často studovány ve vztahu k různým typům nádorů [34,35]. Snížení genové exprese antioxidantních enzymů, včetně *SOD2*, bylo popsáno u chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu ve srovnání se zdravou tkání pankreatu [36]. Wheatley-Price et al. [37] publikovali práci, v které popsali vztah mezi rizikem vzniku adenokarcinomu pankreatu a polymorfismy v genech *MPO* (myeloperoxidáza) a *SOD2* (Ala16Val). Jejich sledovaný soubor byl menší než náš (n=122) a americká populace se svým genofondem liší od evropské. To může být důvod, proč se naše výsledky rozcházejí a žádné vztahy pro sledované polymorfismy enzymů účastnících se na metabolismu volných radikálů v tkáních nebyly v naší studii nalezeny.

Existuje několik omezení této studie, ke kterým je nutno přihlédnout při interpretaci výsledků. Prvním z nich je limitovaný počet vzorků s kompletními daty. Zejména při stratifikaci dle věku, kouření a abusu alkoholu a dalších látek vznikly méně početné skupiny pro statistickou analýzu. Je možné, že při získání většího souboru by se závěry a výsledky mohly lišit. Proto by bylo vhodné výsledky pilotní studie potvrdit v rozsáhlejší multicentrické studii, popř metaanalýzou výsledků více pracovišť. Mezi další faktory, které mohou být potenciálními zdroji chyb a neměly by být opomíjeny, patří předpokládaná genetická různorodost jednotlivých buněk v

rámci tumoru a heterogenita fenotypů nádorů v populaci pacientů.

Kromě polymorfismů v biotransformačních enzýmech byly sledovány genetické alterace v genu *CHEK2*, a to jak u karcinomu pankreatu, tak i u kolorektálního karcinomu. Důvodem byly zajímavé výsledky, které byly touto analýzou zjištěny u karcinomu prsu v naší populaci a vedly k započetí diskuze o jeho zařazení do skříninku dědičné predisposice [38,39].

Mutace c.470T>C postihující FHA-doménu byla nejčasteji zjištěnou alterací v genu *CHEK2* u pacientů s karcinomem pankreatu (6/269 případů; 2,2%), i u pacientů s kolorektálním karcinomem (30/631 pacientů; 4,8%, [40]). Vzhledem k frekvenci této alterace u kontrolní skupiny (2,5%), není zřejmě významná pro vznik pankreatických nádorů ($p=0,815$). Při porovnání všech alterací v FHA-kódující doméně a její blízkosti pak bylo zjištěno jejich vyšší zastoupení u pacientů s karcinomem pankreatu (4/269 případů; 1,5% vs. 2/683 kontrol; 0,3%), stejně jako v předchozí studii u kolorektálního karcinomu (6,2% případů vs. 2,8% kontrol, $p=0,003$; [40]). Na rozdíl od pacientů s nádorovým postižením tlustého střeva a rekta však u pankreatických nádorů byl tento vztah jen na hranici statistické významnosti ($p=0,057$).

Analýza dalších aktivních míst v *CHEK2* jako jsou delece c.1100delC a del5395 nepřinesla významné výsledky, neboť nebyl nalezen ani jeden nosič těchto delecí u pacientů s nádorem slinivky, ani u pacientů s kolorektálním karcinomem. Tyto alterace tak v naší populaci zůstávají významnými jen u karcinomu prsu [38].

Význam polymorfismů v biotransformačních enzymech pro individuální vnímavost ke kolorektálnímu karcinomu

Česká Republika je na seznamu zemí s nejvyšší incidencí kolorektálního karcinomu na světě. Možnými faktory, které se na tomto faktu podílejí, jsou dietní návyky, zejména příjem tučných jídel založených na smaženém a grilovaném vepřovém mase [41], relativně homogenní genetické pozadí [42], a dobrá úspěšnost záchytu a stanovení diagnózy CRC díky plošně probíhajícímu skríningu a dlouhodobě fungujícímu onkologickému registru.

Frekvence variantních alel ve sledovaných polymorfismech biotransformačních enzymů se nelišila u kontrolní skupiny od frekvencí v dříve publikovaných studiích na české populaci [43]. Polymorfismy v *EPHX1* (a to ani jejich vzájemné kombinace), *GSTP1* a *NQO1* neměly významný vztah k riziku vzniku kolorektálního karcinomu. Výsledky získané v této studii korespondují s některými dříve publikovanými pracemi (*EPHX1* - negativní výsledky [44,45]), ale nepotvrdily výsledky publikované jinými laboratořemi (*NQO1* jako rizikový faktor [46,47]; *EPHX1* jako protektivní faktor [48]). Je obecně přijímáno, že studie tohoto typu jsou populačně velmi specifické, a liší se, jak genetickým pozadím studované populace, tak i životním stylem a návyky. Tento fakt, spolu s obvykle různým pojetím náběru vzorků a použitou metodikou stanovení polymorfismů, má za následek vznik některých rozporů ve výsledcích. K interpretaci výsledků je tedy nezbytné mít dostatečně velký soubor vzorků z etnicky dobře definované populace a pokud možno výsledky replikovat na nezávislých populacích, které se neliší v genetickém pozadí a životním stylu.

V této studii bylo nalezeno vyšší riziko vzniku kolorektálního karcinomu u jedinců s *GSTM1-null* genotypem (1,3-krát vyšší), které bylo ještě výraznější při kombinaci s *GSTT1-null* genotypem (1,6-krát). *GSTM1-null* a *GSTT1-null* genotypy byly identifikovány jako rizikové faktory kolorektálního karcinomu rovněž v turecké (OR=1,62; 95% CI=1,06-2,46 a OR=1,64; 95% CI=1,10-2,59; [49]) a v japonské populaci [50]. Na druhou stranu, ve studii prováděné v oblasti Skotska [51] se žádný vztah mezi polymorfismy *GSTM1* nebo *GSTT1* a rizikem vzniku a rozvoje kolorektálního karcinomu prokázat nepodařilo.

Huang et al. [52] ve své práci na populaci afroameričanů a američanů evropského původu popsali vztahy mezi polymorfismy v genech *GSTT1* a *GSTM1* a mírně vyšším rizikem kolorektálního karcinomu. Autoři této studie naznačili možnost etnických odlišností ve vztahu mezi kouřením a genetickou výbavou jedince. V naší studii na homogenní české populaci se však modifikující efekt kouření nepodařilo potvrdit. Moore et al. [53] publikoval vztah mezi vilózním adenomem kolorekta (považován za prekancerózu) a *GSTM1-plus* i *GSTT1-null* genotypy u kuřáků. Roli *GSTM1-null* genotypu jako potenciálního rizikového faktoru kolorektálního karcinomu, zejména u kavkazské populace, potvrdila i nedávná metaanalýza [54].

Dosud publikované výsledky, ve spojení s daty získanými v této dizertační práci, ukazují na určitou roli biotransformačních enzymů, především glutation *S*-transferáz, v rozvoji kolorektálního karcinomu. Přesnou povahu a význam těchto interakcí je třeba dále detailně studovat na větších souborech jedinců. Některé subpopulace mohou mít vyšší

vnímavost k rozvoji malignit a mechanismy, které se na tomto faktu podílejí, se mohou výrazně lišit.

Limitace v interpretaci výsledků této studie vlivu polymorfismů genů biotransformace na vznik a rozvoj kolorektálního karcinomu jsou shodné s výše zmíněnými limitacemi podobně koncipované studie u karcinomu pankreatu.

Identifikace referenčních genů pro qPCR tkání karcinomu pankreatu

Výzkum nádorů slinivky břišní je velmi obtížný, co se týká získávání kvalitních vzorků tkání a dat u pacientů s krátkou dobou celkového přežívání a špatným výkonnostním stavem. Většina pacientů má v době diagnózy již inoperabilní stádium tumoru, takže není možné z etických důvodů získat tkáň k histologické verifikaci. Navíc, vzhledem k vysokému množství degradačních enzymů přítomných v pankreatické tkáni, je velmi obtížné vyizolovat dostatečně množství kvalitní RNA. Úkolem této práce bylo identifikovat nejstabilnější endogenní kontrolní geny ve studovaných vzorcích získaných od pacientů s adenokarcinomem slinivky břišní, které budou sloužit pro další analýzy hladin transkriptů kandidátních genů pomocí qPCR metody. Pozornost byla věnována zejména kvalitě RNA, efektu degradace na výsledky qPCR a otázce minimalizace těchto efektů vhodnou normalizací výsledků.

Vzorky byly nabírány za striktně stejných podmínek. Přesto jsme našli významný rozdíl v kvalitě RNA hodnocené pomocí RIN mezi nádorovou tkání a kontrolní pankreatickou tkání bez nádorových změn. U všech deseti párů vzorků nádorová tkáň vykazovala nižší stupeň degradace RNA vůči své párové kontrolní tkáni. Nabízí se tedy otázka, zda je

množství RNAáz v tumoru významně nižší než ve výchozí tkáni slinivky.

Průměrný RIN v námi hodnocených nádorech byl $6,4 \pm 1,0$ a v okolní kontrolní tkáni $3,2 \pm 1,6$. Toto zjištění je ve shodě s dříve otištěnou prací, která uvádí, že RIN u RNA izolované z různých tkání se obvykle pohybuje mezi 6-8, kromě tkání gastrointestinálního traktu, kde jsou výraznější rozdíly s RINem kolem 4 [55].

Fleige et al. [56] našli významný vliv hodnoty RIN na výsledek qPCR, zejména na počet cyklů PCR (Ct) a méně pak na úspěšnost PCR reakce (E). Antonov et al. [57] dále demonstrovali na biologicky homogenním systému intaktní a částečně degradované RNA z buněčných linií, že degradací způsobený posun v Ct hodnotách může být kompenzován pomocí výpočtů deltaCt mezi testovanými geny a průměrným Ct několika referenčních genů. Tyto deltaCt hodnoty byly méně citlivé k fragmentaci RNA a nebyly ovlivněny ani rozdílným množstvím použité RNA. V našem experimentu korelovalo průměrné Ct všech testovaných genů v kontrolní tkáni s RIN. Použili jsme normalizaci pomocí interního standardu 18S (Ct_{genu}/Ct_{18S}), čímž došlo k normalizaci vztahu mezi RINem a Ct hodnotou studovaných genů. U nádorové tkáně nebyla významná korelace pozorována před ani po této normalizaci.

Demonstrovali jsme tedy, že degradací způsobený posun v Ct hodnotách, u expresních studií pomocí qPCR metody, lze kompenzovat normalizací Ct genu s Ct hodnotou endogenní kontroly genu 18S.

Provedli jsme stanovení hladin transkriptů 24 kandidátních referenčních genů vybraných z komerčně dostupných endogenních kontrol. Pro tuto analýzu byly

vybrány 2 nejčastěji používané programy a to NormFinder a geNorm. Oba tyto programy vyhodnotily výsledky podobně, přestože se pořadí genů podle stability neshodovalo zcela. Geny *EIF2B1*, *ELF1*, *MRPL19* a *POP4* však patřily k prvním pěti nejvhodnějším ve výsledcích obou programů. Účinnost qPCR reakce, stejně jako sklon a linearita kalibračních křivek referenčních genů by měla prověřena před samotným profilováním [58]. Ověřili jsme tedy, že námi vybrané geny splňují kritéria pro použití v qPCR dle MIQE [59] a můžeme tyto referenční geny použít pro studium pankreatických nádorů pomocí qPCR.

Expresní studie ABC a SLC transportérů u karcinomu pankreatu

ABC transportéry hrají roli v mnoha aspektech nádorových onemocnění. Kromě výše zmíněné a dobře známé mnohočetné lékové rezistence, která byla popsána u 14 zástupců této rodiny enzymů, se ABC transportéry podílejí i na vzniku a rozvoji nádorového procesu.

König et al. [60] stanovovali pomocí real-time PCR hladiny exprese mRNA devíti členů ABCC podrodiny a genu ABCG2 ve vzorcích tkáně zdravé nenádorové slinivky břišní a v nádorech pankreatu (n=37). V jejich souboru byla přítomna jak v nádorové, tak i nenádorové tkáni exprese mRNA genů ABCC1, ABCC3, ABCC4 a ABCC5. cDNA fragmenty odpovídající délky byly identifikovány i pro geny ABCC2, ABCC6, ABCC10 a ABCC12, ale jejich amplifikace při korelaci s mRNA expresí beta-aktinu byla velmi nízká a *ABCC11* nebyl amplifikován vůbec. V našem souboru vzorků byly hladiny exprese mRNA *ABCC11*, *ABCC12* a *ABCC13* rovněž velmi nízké, ale na rozdíl od předchozí studie zde byly

naměřeny dobře detekovatelné hladiny transkriptů pro geny *ABCC2*, *ABCC6* a *ABCC10*. Bylo popsáno, že se hladiny exprese mRNA *ABCC1* a *ABCC4* neliší mezi nádorovou a nenádorovou tkání slinivky břišní, zatímco v tkáni karcinomu pankreatu dochází k upregulaci genů *ABCC3* a *ABCC5* [60]. Autoři usuzují, že právě tyto geny (*ABCC3* a *ABCC5*) jsou zapojeny ve vzniku chemorezistence buněk adenokarcinomu pankreatu vůči cytostatikům a analýza jejich exprese u pacientů může přispět k zlepšení predikce jejich odpovědi na terapii. Náš výzkum tuto upregulaci *ABCC3* a *ABCC5* v nádorové tkáni potvrdil na nezávislém souboru vzorků. Na rozdíl od předchozí studie jsme našli rovněž přítomnou upregulaci v nádorech i u dalších dvou genů (*ABCC1* a *ABCC10*).

Námi vysledovaná upregulace genů *ABCB4*, *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC5* a *ABCC10* ($p \leq 0.005$) v tumorózní tkáni je v souladu s jejich již stanoveným fenotypem mnohočetné lékové rezistence [15]. Na základě výsledků této pilotní studie lze usuzovat, že tyto ABC transportéry mohou být možnými genetickými markery nádorové odpovědi, a je třeba provést další podrobnější analýzy, jak tento fenotyp tumorů koreluje s léčebnou odpovědí pacientů.

Naopak byly nalezeny čtyři geny downregulované v tumorech pankreatu, a to *ABCA3*, *ABCA5*, *ABCC6* a *ABCC7*. *ABCA3* transportér je nejvíce exprimován v plicní tkáni, ale jeho exprese byla nalezena také v mozku, srdci a tkáni zdravé slinivky břišní [190]. Mutace tohoto genu jsou spojeny se syndromem dechové tísně a nedostatkem surfaktantu u novorozenců [191]. Nicméně funkce *ABCA3* v tkáních pankreatu zatím nebyla objasněna.

Mutace v genu *ABCC6* se vyskytují u multisystémového onemocnění *Pseudoxanthoma elasticum* [192]. Jeho přítomnost a funkce ve tkáních slinivky, nebo jejích nádorech zatím nebyla studována. Mutace *ABCC7* jsou podkladem pro cystickou fibrózu [193]. Navíc transportér *ABCC7* váže syntaxin 1A (regulátor membránové fúze) [194], sodný kanál [195] a endocystický adaptórový komplex AP-2 [196].

Díky existenci těchto závažných genetických poruch se tak ukazuje, že ABC transportéry, jako komponenty větších membránových komplexů, se s největší pravděpodobností podílejí na širším spektru biologických aktivit. Vzhledem k nedostatku údajů v literatuře o významu těchto genů pro vznik, vývoj a terapii nádorů slinivky, zůstává jejich zjištěná downregulace předmětem spekulací a slibné pole pro další výzkum.

Studie hladin transkriptů genů v tkáních bez korelace s expresí proteinů stanovenou imunohistochemicky se jeví jako jedna z největších limitací této práce. Nicméně imunohistochemická analýza je semi-kvantitativní metodou a odráží pouze přítomnost proteinů bez průkazu jejich skutečné aktivity. Navíc stanovování přítomnosti proteinů je silně ovlivněno i volbou protilátek, jejich specifiou a selektivitou.

Mezi další limitace patří malý soubor pacientů a absence širších klinických dat týkající se léčby a průběhu onemocnění. Proto všechny tyto výsledky musí být interpretovány s přihlednutím k těmto limitacím a je nezbytné je ověřit pomocí dalších typů analýz na větším souboru vzorků.

5. Závěry

Cíl práce se opíral o hypotézu, že polymorfismy v biotransformačních enzýmech mohou ovlivňovat riziko karcinogeneze. Prvním úkolem tohoto projektu bylo studovat vztahy mezi polymorfismy v genech metabolismu složek cigaretového kouře a alkoholu, jmenovitě *CYP2A13*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *NQO1*, *NQO2*, *SOD2*, *SOD3*, *ADH1B* a *ADH1C* a rizikem vzniku karcinomu kolorekta a pankreatu. Pomocí metody PCR-RFLP, alel-specifické PCR reakce a PCR v reálném čase bylo vyšetřeno 235 pacientů s diagnózou nádorového onemocnění slinivky břišní, 495 pacientů s kolorektálním karcinomem a 760 zdravých kontrol bez přítomnosti onkologického onemocnění.

Pro většinu námi sledovaných polymorfismů se nepodařilo prokázat vztah mezi jejich přítomností a rizikem vzniku obou těchto malignit. Negativní výsledky studií jsou cenným příspěvkem do meta-analýz, které podávají ucelenou informaci o významu genetických faktorů v etiologii onemocnění. Podařilo se nám získat některé prioritní a zajímavé výsledky. Variantní alela *CYP2A13**7 (*Arg101STOP*), kódující inaktivní enzym byla nalezena u 7 z 265 hodnocených zdravých kontrol, ale nebyla nalezena u žádného pacienta s karcinomem pankreatu (n=235). Tento silný trend, u kterého vzhledem k absenci variantní alely v souboru pacientů nelze vyjádřit statistickou významnost, naznačuje možnost úlohy genu *CYP2A13* v etiologii karcinomu pankreatu. Výskyt variantní alely *GSTP1-Val* a genotypu *GSTT1-null* byl naopak spojen se zvýšeným rizikem vzniku nádoru pankreatu (OR=2,38; 95% CI=1,17-4,83). V souboru pacientů s kolorektálním karcinomem byl genotyp

GSTT1-null v kombinaci s *GSTM1-null* genotypem spojen s mírně zvýšeným rizikem (OR=1,58; 95% CI=1,01-2,47) a samotná delece *GSTM1* zvyšovala riziko kolorektálního karcinomu po zohlednění ostatních sledovaných faktorů (OR=1,30; 95% CI=1,01-1,68).

Naše výsledky ukazují, že polymorfismy v genech kódující biotransformační enzymy, zejména aktivační cytochrom P450 2A13 a detoxikační glutation *S*-transferázy, mohou ovlivňovat riziko vzniku maligního onemocnění slinivky břišní a tlustého střeva v české populaci. Výsledky získané v rámci uvedené pilotní studie jsou dobrým základem pro nutné ověřující analýzy na větších souborech pacientů, eventuálně meta-analýzy souborů charakterizujících bělošskou populaci s obdobným životním stylem.

Dalším úkolem bylo charakterizovat úlohu vybraných funkčně významných alterací v genu CHEK2 (FHA doména s přilehlou oblastí, del1100, rozsáhlá delece del 5395bp) v patogenezi sporadického karcinomu pankreatu. Stejně jako dříve v případě kolorektálního karcinomu, i v naší studii bylo riziko vyšší pro jedince s přítomnou mutací v oblasti FHA domény, avšak tento vztah byl na hraně statistické významnosti ($p=0,057$). Delece 5395 bp nebyla v žádném ze sledovaných souborů nalezena a zůstává tak zatím významnou pouze pro karcinom prsu v naší populaci.

Další hypotéza byla postavena na faktu, že pacienti s nádory odpovídají rozdílně na podanou chemoterapii. V řadě modelových systémů byly identifikovány geny interagující s účinkem cytostatik používaných pro léčbu karcinomu kolorekta a pankreatu. Rozdílné exprese těchto genů by tedy měly být hlavním důvodem pro vznik rezistence vůči chemoterapii. Pro studium rozdílů expresí genů 3. fáze

biotransformace (zejména ABC transportérů) bylo nutné zavedení optimální metodiky.

Karcinom pankreatu se řadí k velmi problematickým nádorům z hlediska analýzy genové exprese. Podařilo se nalézt optimální protokol odběru tkáně, transportu, skladování, izolace celkové RNA s následnou analýzou její kvality a kvantity podle nejnovějších metod a doporučení. Úkolem této práce bylo i identifikovat nejstabilnější referenční geny ve studovaných vzorcích získaných od pacientů s adenokarcinomem slinivky břišní, které budou sloužit pro normalizaci výsledků analýzy pomocí qPCR metody. Provedli jsme skrínig 24 kandidátních referenčních genů, vybraných z komerčně dostupných endogenních kontrol. Ověřili jsme, že námi vybrané nejstabilnější geny v pankreatické tkáni a karcinomu pankreatu *EIF2B1*, *ELF1*, *MRPL19* a *POP4* splňují všechna potřebná kritéria a jsou vhodnými pro studium pankreatických nádorů pomocí qPCR.

Porovnáním exprese všech 49 členů lidské nadrodiny ABC transportérů u deseti vzorků nádoru pankreatu s okolní nenádorovou tkáni pankreatu pomocí qPCR jsme zjistili, že 11 genů bylo statisticky významně upregulováno a 4 downregulovány ($p < 0,05$) v tkáni adenokarcinomu. Zjištěná zvýšená exprese *ABCB2* (2,2x), *ABCB3* (2,2x), *ABCB4* (5,3x), *ABCC1* (1,6x), *ABCC5* (2,2x) v nádorové tkáni může, ve shodě s jejich dříve prokázaným fenotypem mnohočetné lékové rezistence, ovlivnit výsledek léčby onemocnění. Downregulace *ABCA3*, *ABCA5*, *ABCC6* a *ABCC7* ve tkáni karcinomu pankreatu zatím nebyla publikována.

Výsledky pilotní studie zaměřené na expresi ABC transportérů ve tkáni karcinomu pankreatu tedy prokázaly významné rozdíly v hladinách transkriptů těchto

membránových enzymů, které jsou klíčové pro transport cytostatik ven z nádorových buněk. K ověření výsledků pilotní studie probíhá rozsáhlejší studie, kde bude navíc zohledněna i odpověď na podávanou chemoterapii. Pomocí metodiky zavedené v této práci nyní na našem pracovišti probíhá výzkum exprese ABC transportérů a hodnocení jejich významu pro výsledek chemoterapie u kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu.

6. Použitá literatura

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* **2007**;18: 581-592.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* **2008**;58(2):71-96.
3. Lo AC, Soliman AS, El-Ghawalby N, et al. Lifestyle, occupational, and reproductive factors in relation to pancreatic cancer risk. *Pancreas.* **2007**;35:120-129.
4. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA.* **1995**;273:1605-1609.
5. Mukesh V. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat.* **2005**;4:295-301.
6. Kiyohara. Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer. *J Epidemiol.* **2000**;10:349-360.
7. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol.* **2008**;3:157-188.
8. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* **2000**;343:78-85.
9. Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet.*

- 2008**;40:623-30.
10. Houlston RS, Cheadle J, Dobbins SE, et al. Meta-analysis of three genome-wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33. *Nat Genet.* **2010**;42:973-7.
 11. Schutte M, Seal S, Barfoot R, et al. Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *Am J Hum Genet.* **2003**;72(4):1023-8.
 12. Klener P, Abrahámová J, Fait V, et al. Klinická onkologie. Praha, Galén, pp 429-433, **2002**.
 13. Soucek P, Xenobiotics. Encyclopedia of Cancer, druhé vydání.. New York, Springer-Verlag, **2008**. ISBN 978-3-540-47648-1.
 14. <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm> (říjen, 2010)
 15. Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc).* **2008**;73(5):592-604.
 16. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, et al. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* **2004**;447:735-743.
 17. Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.* **2004**;447(5):728-734.
 18. Mackey JR, Mani RS, Selner M, et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res.* **1998**;58(19):4349-4357.
 19. Rosty C, Ueki T, Argani P, et al. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol.* **2002**;160:45-50.
 20. Fleige S, Walf V, Huch S, et al. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* **2006**,19:1601-13.
 21. Zatonski WA, Boyle P, Przewozniak K, et al. Cigarette smoking, alcohol, tea and coffee consumption and pancreas cancer risk: a case-control study from Opole, Poland. *Int J Cancer.* **1993**;53:601-607.
 22. Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi A, et al. Green tea consumption and the risk of pancreatic cancer in Japanese adults. *Pancreas.* **2008**;37:25-30.

23. Su T, Bao Z, Zhang QY, et al. Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* **2000**;60:5074-5079.
24. Jiao L, Silverman DT, Schairer C, et al. Alcohol use and risk of pancreatic cancer: the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Epidemiol.* **2009**;169:1043-1051.
25. Rohrmann S, Linseisen J, Vrieling A, et al. Ethanol intake and the risk of pancreatic cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control.* **2009**;20:785-794.
26. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2009**;18:765-776.
27. Carlsten C, Sagoo GS, Frodsham AJ, et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* **2008**;167:759-774.
28. Jiao L, Bondy ML, Hassan MM, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk and survival of pancreatic cancer. *Cancer.* **2007**;109:840-848.
29. Liu G, Ghadirian P, Vesprini D, et al. Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 and risk of pancreatic adenocarcinoma, *Br J Cancer.* **2000**;82:1646-1649.
30. Khandrika L, Kumar B, Koul S, et al. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett.* **2009**;282:125-136.
31. Wittel UA, Pandey KK, Andrianifahanana M, et al. Chronic pancreatic inflammation induced by environmental tobacco smoke inhalation in rats. *Am J Gastroenterol.* **2006**;101:148-159.
32. Hao J, Li G, Pang B. Evidence for cigarette smoke-induced oxidative stress in the rat pancreas. *Inhal Toxicol.* **2009**;21:1007-1012.
33. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes.* **2005**;54:727-735.
34. Kang D, Lee KM, Park SK, et al. Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung,

- colorectal, and ovarian cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2007**;16:1581-1586.
35. Vineis P, Veglia F, Garte S, et al. Genetic susceptibility according to three metabolic pathways in cancers of the lung and bladder and in myeloid leukemias in nonsmokers. *Ann Oncol.* **2007**;18:1230-1242.
36. Cullen JJ, Mitros FA, Oberley LW. Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas.* **2003**;26:23-27.
37. Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, et al. Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer.* **2008**;112:1037-1042.
38. Kleibl Z, Havranek O, Novotny J, et al. Analysis of CHEK2 FHA domain in Czech patients with sporadic breast cancer revealed distinct rare genetic alterations. *Breast Cancer Res Treat.* **2008**;112(1):159-64.
39. Walsh T, Casadei S, Coats KH, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA.* **2006**;295(12):1379-88.
40. Kleibl Z, Havranek O, Hlavata I, et al. The CHEK2 gene I157T mutation and other alterations in its proximity increase the risk of sporadic colorectal cancer in the Czech population. *Eur J Cancer.* **2009**;45(4):618-24.
41. Dofkova M, Kopriva V, Resova D, et al. The development of food consumption in the Czech Republic after 1989. *Public Health Nutr.* 2001;4: 999-1003.
42. Heath SC, Gut IG, Brennan P, et al. Investigation of the fine structure of European populations with applications to disease association studies. *Eur J Hum Genet.* **2008**;16:1413-1429.
43. Sarmanova J, Susova S, Gut I, et al. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet.* **2004**;12:848-854.
44. Robien K, Boynton A, Ulrich CM. Pharmacogenetics of folate-related drug targets in cancer treatment. *Pharmacogenomics.* **2005**;6:673-689.
45. van der Logt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, et al. Role of

- epoxide hydrolase, NADP:H:quinone oxidoreductase, cytochrome P450 2E1 or alcohol dehydrogenase genotypes in susceptibility to colorectal cancer. *Mutat Res.* **2006**;593(1-2):39-49.
- 46.Haber PS, Apte MV, Applegate TL, et al. Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med.* **1998**;132:294-302.
- 47.Begleiter A, Hewitt D, Maksymiuk AW, et al. A NADP:H:quinone oxidoreductase 1 polymorphism is a risk factor for human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2006**;15:2422-2426.
- 48.Sachse C, Smith G, Wilkie MJ, et al. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis.* **2002**;23:1839-1849.
- 49.Camdeviren H. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet.* **2005**;43:149-163.
- 50.Yoshioka M, Katoh T, Nakano M, et al. Glutathione S-transferase (GST) M1, T1, P1, Nacetyltransferase (NAT) 1 and 2 genetic polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer. *J UOEH.* **1999**;21:133-147.
- 51.Little J, Sharp L, Masson L et al. Colorectal cancer and genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1: a case-control study in the Grampian region of Scotland. *Int J Cancer.* **2006**;119:2155-2164.
- 53.Huang K, Sandler RS, Millikan RC, et al. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, cigarette smoking, and risk of colon cancer: a population-based casecontrol study in North Carolina (United States). *Cancer Causes Control.* **2006**;17:385-394.
- 53.Moore LE, Huang WY, Chatterjee N, et al. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2005**;14:1823-1827.
- 54.Gao Y, Cao Y, Tan A, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and sporadic colorectal cancer risk: an updating meta-analysis and HuGE review of 36 casecontrol studies. *Ann Epidemiol.* **2010**;20:108-121.
- 55.Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* **2006**;27:126-139.
- 56.Fleige S, Walf V, Huch S, et al. Comparison of relative mRNA

- quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* **2006**;19:1601-13.
57. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M, Fleischmann A, Altermatt HJ, Jaggi R. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest.* **2005**;85:1040-1050.
58. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-deltaCt methods. *Methods.* **2001**;25:402-408.
59. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* **2009**;55(4):611-22.
60. König J, Hartel M, Nies AT, et al. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer.* **2005**;115(3):359-67.
61. Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta.* **2006**;1762:510-24.
62. Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, et al. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med.* **2004**;350:1296-1303.
63. Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, et al. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet.* **2000**;25(2):228-31.
64. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* **1989**;245(4922):1066-73.
65. Naren AP, Quick MW, Collawn JF, et al. Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc Natl Sci USA.* **1998**;95:10972-10977.
66. Hanrahan JW, Mathews CJ, Grygorczyk R, et al. Regulation of the CFTR chloride channel from human and sharks. *J Exp Zool.* **1996**;275:283-291.
67. Weixel KM, Bradbury NA. The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J Biol Chem.* **2000**;275:3655-3660.

Seznam publikací doktoranda:

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s impact factorem :

1. Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, Liska V, Pitule P, Novak P, Bruha J, Vycital O, Holubec L, Treska V, Vodicka, P, Soucek P. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis*. **2012**;27(2):187-96. **IF:4,0**

2. Vrana D, Pikhart H, Mohelnikova-Duchonova B, Holcatova I, Strnad R, Slamova A, Schejbalova M, Ryska M, Susova S, Soucek P. The association between glutathione S-transferase gene polymorphisms and pancreatic cancer in Central European Slavonic population. *Mutat Res*. **2009**;680(1-2):78-81. **IF:2,9**

3. Mohelnikova-Duchonova B, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z, Soucek P. CYP2A13, ADH1B and ADH1C Gene Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk. *Pancreas*. **2010**;39(2):144-8. **IF:2,6**

4. Mohelnikova-Duchonova B, Marsakova L, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z, Slamova A, Schejbalova M, Soucek P. Superoxide Dismutase and NAD(P)H Quinone Oxidoreductase Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk. *Pancreas*. **2011**;40(1):72-8. **IF:2,6**

5. Mohelnikova-Duchonova B, Oliverius M, Honsova E, Soucek P. Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma. *Dis Markers*. 2011 - přijato k publikaci.

IF:1,7

6. Hlavata I, Vrana D, Smerhovsky Z, Pardini B, Naccarati A, Vodicka P, Novotny J, Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P. Association between exposure-relevant polymorphisms in CYP1B1, EPHX1, NQO1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 and risk of colorectal cancer in a population. *Oncol Rep*. **2010**;24(5):1347-53.

IF:1,7

7. Mohelnikova-Duchonova B, Havranek O, Hlavata I, Foretova L, Kleibl Z, Pohlreich P, Soucek P. The CHEK2 gene I157T, other alterations in the fork-head associated domain and del5395 do not modify the risk of pancreatic cancer in the Czech population. *Cancer Epidemiol*. **2010**;34(5):656-8.

IF:1,2

b) bez impact factoru:

8. Mohelnikova-Duchonova B. Pancreatic Cancer: What is the Role of ABC Transporters? *Pancreatic Dis Ther*. **2011**; 1:e101. Doi:10.4172/pdt.1000e101.

9. Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P. Role membránových transportérů v chemorezistenci karcinomu pankreatu při terapii gemcitabinem. *Klin Onkol*. **2010**;23(5):306-10.

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s impact factorem:

10. Soucek P, Susova S, Mohelnikova-Duchonova B, Gromadzinska J, Moraviec-Sztandera A, Vodicka P, Vodickova L. Polymorphisms in metabolizing enzymes and the risk of head and neck squamous cell carcinoma in the Slavic population of the central Europe. *Neoplasma*. **2010**;57(5):415-21. **IF:1,5**

3. kapitoly v knize

11. Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P. The Role of Membrane Transporters in Cellular Resistance of Pancreatic Carcinoma to Gemcitabine and Erlotinib. *Horizons in Cancer Research, Volume 46*, (Hiroto S. Watanabe ed.), NOVA Science Publishers Inc., NY, USA, 2011.