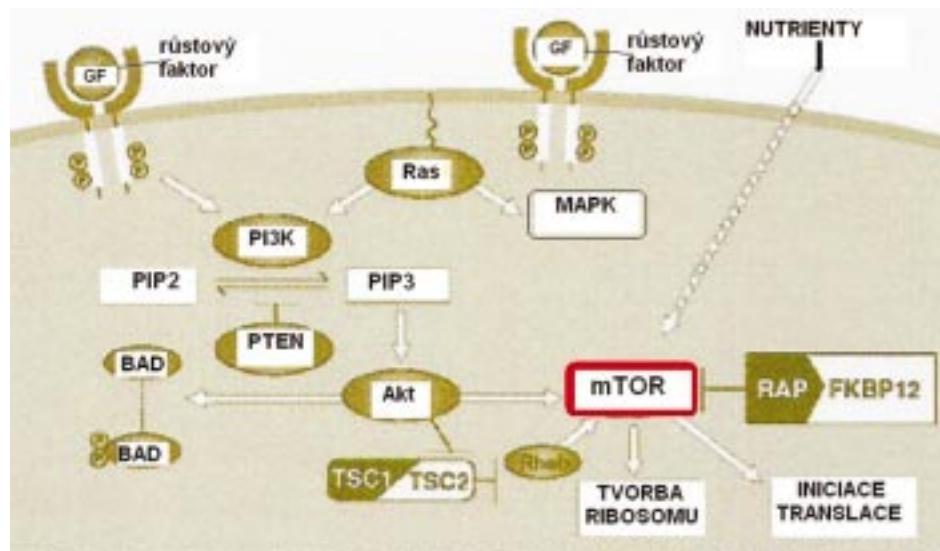


Cílové molekuly

pro terapii nádorů (2. část)

Molekula mTOR (cíl pro rapamycin)

Cílová molekula pro účinek rapamycinu u savců (**Mammalian Target of Rapamycin = mTOR**) má klíčový význam v řadě různých signálních drah spojených se stimulací mitogeneze a nutričních požadavků pro syntézu proteinů nezbytných pro postup buněčného cyklu dělení a buněčnou proliferaci. Signál (růstové faktory) přichází z aktivovaného receptoru (IGFR, PDGFR, EGFR nebo HER) a přímo aktivuje PI3K/Akt-dráhu anebo je zprostředkován molekulou RAS s následnou signalizací MAPK-dráhy. Funkce mTOR jako senzoru pro nutriční požadavky buňky pro její dělení se děje ještě další cestou.



Obr. 1: Schéma signalizace za účasti mTOR

Gen pro mTOR je lokalizován na chromosomu 1p36.2 a kóduje velkou (289 kDa) serin/threonin-proteinkinasu z evolučního hlediska značně konzervovanou, pro což svědčí to, že některé její domény mají klíčový význam pro důležité buněčné aktivi-

ty. Pro nádorové bujení a terapeutický cíl má význam především *FKBP 12 - rapamycin- vázající doména*. **FKBP12**, což je malý proteinový segment (12 kDa - cytosolový imunofilin), nutný pro správnou funkci molekuly mTOR.

Rapamycin (sirolimus) (RAP) je makrolidové antibiotikum produkované *Streptomyces hygroscopicus*, které má neobvyčejně antimikrobiální, imunosupresivní a antikancerózní účinky. Váže se v buňkách na molekulu **FKBP12**. Vzniklý komplex (*RAP/FKBP12*) způsobuje inhibici nejen kinasové aktivity mTOR, ale též fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) tj. dráhy PI3K/Akt. To výrazně ovlivňuje modulaci aktivity proteinů, které jsou klíčové pro tvorbu ribosomů a translační iniciaci

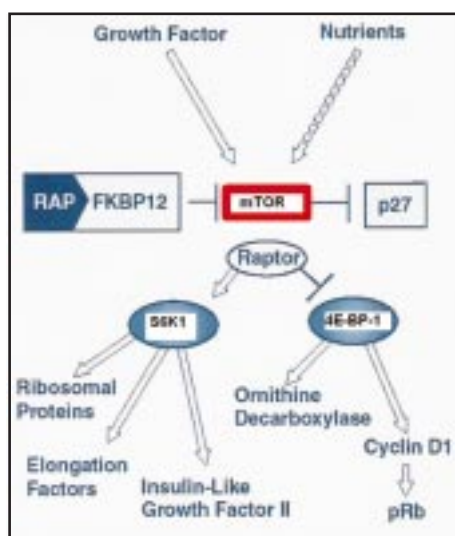
mRNA vyúsťující v syntézu růstových faktorů, onkoproteinů a regulátorů buněčného cyklu dělení. Převažujícím efektem inhibice aktivity mTOR je zástava buněčného cyklu mezi střední a pozdní G1-fází před iniciací S-fáze. Aktivace PI3K/Akt

dráhy hraje velmi důležitou úlohu při maligní transformaci buněk a jejich chemorezistenci tím, že indukuje přežívání (antiapoptózu) a migraci buněk a navozuje angiogenezi. Odchytky signalizace PI3K/Akt dráhy po aktivaci mTOR byly prokázány u řady lidských tumorů. Alterované molekuly PI3K i Akt jsou onkogeny. Trvale zvýšená aktivita Akt byla nalezena u karcinomu prostaty a karcinomu prsu provážené špatnou prognózou. Také amplifikace genu pro PI3K a Akt byla zaznamenána u maligních tumorů děložního čípku, vaječníku, žaludku a slinivky břišní.

Transdukce signálu zprostředkovaná aktivací mTOR vyúsťuje ve dvě paralelní signalizace, které kontroly translaci mRNA. Jde o: (1) Fosforylaci eukaryontního translačního iniciačního faktoru *4E-BP1* a (2) fosforylaci ribosomovou protein-S6-kinasu (*p70s6k* neboli *S6K1*). Při fosforylaci *4E-BP1* dochází k inaktivaci, zatímco fosforylace *S6K1* způsobuje jejich aktivaci. Modulační mTOR aktivity obou efektorů vede ke zvýšení syntézy proteinů, které podporují postup buněčného cyklu dělení a kromě toho tyto signální dráhy limitují rychlost progresu cyklu. Interakce mTOR s *4E-BP1* a s *S6K1* se děje pomocí malého proteinu (150 kDa) zvaného *raptor* (regulatory associated protein of mTOR), který je pro jeho účinek nezbytný.

4E-BP1 je nízkomolekulový protein, který potlačuje aktivitu komplexu eukaryontového iniciačního faktoru 4 (eIF-F4). Ve svém nefosforylovaném stavu se váže *4E-BP1* pevně k eIF-F4; mRNA-čepičku vázající podjednotka (cap-binding subunit) komplexu eIF-F4 je převážně nefosforylovaná v klidových buňkách (bez působení růstových faktorů). Proliferační pod-

něty navozené hormony (insulin), růstovými faktory (IGF-1, EGF, VEGF), mitogeny, cytokiny, agonisty sdruženými s G-proteinem nebo nutrienty způsobují fosforylaci 4E-BP1 v pozici 5 serinu a threoninu prostřednictvím mTOR a dalších kinas. Tato fosforylace způsobí odpojení eIF-4E z komplexu s 4E-BP1 a umožní mu tak navázat se na další komponenty jako je eIF-4G, ATP-dependentní RNA helikasa eIF-4A a eIF-4B a vytvořit aktivní komplex navozující „cap-dependent“ translaci sady mRNA, kódující syntézu proteinů potřebných pro buněčnou proliferaci a přechod z G₁ do S-fáze cyklu jako je c-myc, cyklin D₁ a ornithindekarboxylasa. Cyklin D₁ se váže s cyklin-dependentní kinasou 4 (CDK4/cyklin D₁) a vytváří komplex potřebný pro fosforylaci retinoblastomového proteinu pRb, který se podílí na postupu buněčného cyklu a replikaci DNA. Deprivace (znemožnění účinku) růstových faktorů nebo inhibice mTOR má za následek defosforylaci 4E-BP1 a poté její reasociaci s eIF-4E, a tím omezení „cap-dependent“ translace příslušné mRNA. Molekula mTOR ale také nepřímo ovlivňuje stav fosforylace 4E-BP1 tím, že moduluje aktivitu protein-fosfatasy 2A (PP2A), která defosforyluje už fosforylovanou 4E-BP1. Zvýšená hladina translačního inicičního faktoru eIF-4E byla nalezena u řady nádorů jako je karcinom prsu, močového měchýře, nonhodgkinského lymfomu nebo karcinomu z dlaždicových buněk hlavy a krku. Podpora exprese eIF-4E zvyšuje translaci prometastatických proteinů podporujících neoangiogenezi (VEGF) nebo antiapoptózu (Bcl-2).



Obr. 2: Buněčné efekty signalizace prostřednictvím mTOR a jeho blokáda rapamycinem

S6K1 serin/threonin-kinasa je druhým hlavním efektem signalizace zprostředkované mTOR. Signál z transdukce dráhy PI3K/Akt fosforyluje mTOR a následně S6K1, která fosforyluje a aktivuje 40S ribosomový S6 protein, což umožňuje, aby 40S ribosomová podjednotka vytvořila aktivně translatické polyribosom. Především je podpořena translace mRNA s 5'-terminální oligopyrimidovou sekvencí (5'TOP). Tato mRNA kóduje primárně ribosomové proteiny, elongační faktory a insulinu-podobný růstový faktor II (IGF-II). Proto *defosforylace S6K1 snižuje syntézu proteinových komponent translačního systému*, což vede k výraznému snížení proteosyntézy.

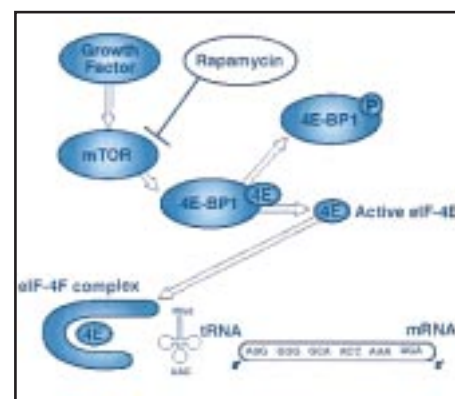
Regulace aktivity S6K1 je však komplikovanější než jednoduchá aktivace zprostředkovaná mTOR. Může se totiž dít též mTOR-nondependentními drahami jako je 3-fosfoinositid-dependentní kinasa-1 nebo mitogenem a stresem aktivovaná proteinkinasa (MAPK). Na druhé straně je však nutno připomenout, že *mTOR může i nepřímo působit na S6K1* potlačením inaktivující defosforylace rapamycin-senzitivního místa na molekule S6K1 navozené serin/threonin-proteinfosfatasy. Nadměrná exprese S6K1 byla nalezena u karcinomu prsu a byla sdružena se zvýšeným rizikem návratu choroby u některých typů. Také amplifikace *genu pro S6K1 chromosomu 17q22-q24* byla prokázána u 10 % pacientů s karcinomem prsu.

Z toho, co bylo řečeno vyplývá, že kromě S6K1 a 4E-BP1 jsou ještě další klíčové molekuly signalizace zprostředkované mTOR, které se mohou stát terapeutickým cílem. Patří mezi ně zejména:

Protein cyklinu D1 - odchylky (aberrace) v jeho molekule byly prokázány u široké škály tumorů. Nadměrná exprese cyklinu D1 byla nalezena asi u 50 % invazivních karcinomů prsu; podobně u karcinomu ovaria nebo u neuroendokrinních tumorů; jeho zvýšení provázelo špatnou prognózu.

CDK inhibitor p27 (p27KIP1) je další efektor signalizace po mTOR. V klidových buňkách je p27 přítomen ve vysokém množství, ale jeho obsah se výrazně snižuje po mitogenním signálu. Je to důkaz, že jeho „downregulace“ je nutná pro vstup buněčného cyklu do S-fáze. Inhibice mTOR rapamycinem zvyšuje produkci jak p27-RNA tak následný protein, což

vede k podpoře tvorby komplexu cyklin E/CDK2-p27, který inhibuje aktivitu CDK2 a tím navozuje blok mezi G₁ a S-fází. Toto přispívá k inhibici translace dalších mRNA, obsahujících 5'TOP a vysvětluje to, proč inhibitory mTOR brzdí přechod G₁ do S-fáze. Snížená hladina p27 ukazuje na horší průběh některých malignit. Platí to kupř. pro karcinomy prsu, prostaty nebo ledvin. **RNA polymerasy I a III** jsou rovněž regulovány signalizací přes mTOR. RNA-polymerasa I je odpovědná za transkripci genů kódujících ribosomovou (mRNA) a transferovou RNA (tRNA). Tento mechanismus přispívá k modulaci translačního procesu při inhibici mTOR.



Obr.3: Blokáda signalizace Rapamycinem - vliv na translaci

Aplikace rapamycinu prokázala, že též navozuje apoptózu (studie *in vitro*) u B-lymfocytů, u renálních tubulárních buněk, dále u dendritických buněk a u buněk rhabdomyosarkomu. Podporuje též zástavu cyklu jak v buňkách normálních tak v maligně transformovaných tím, že *kooperuje s transformujícím růstovým faktorem β (TNF β*, pravděpodobně prostřednictvím inhibice aktivity cyklin/CDK2. Blokuje též signalizaci podporující apoptózu; eliminuje inaktivaci proapoptózy faktoru **Bad** navozovanou vazbou s S6K1.

Další inhibitory mTOR (analogy rapamycinu)

Blokovat aktivitu mTOR je snahou řady studií, a tak už se objevily první zprávy o nadějných inhibitech - analogích rapamycinu, aby byly zlepšeny jeho farmakologické vlastnosti. **IC50** byl v pokusech *in vitro* na buněčných kulturách rakovinných buněk účinný ještě v nanomolárních koncentracích, **CCI-779** (Cell cycloin inhibitor-779) (rapamycin-41, 2,2-

bis[2/hydroxymethyl]-propanová kyselina) a **RAD001** (everolimus; 40-O-[2-hydroxyethyl]-rapamycin) dokonce ve femtomolárních. Jednalo se o buněčné kultury širokého spektra nádorů: karcinom prsu, prostaty, pankreatu, malobuněčný karcinom plic, rhabdomyosarkom, melanom a leukemie z T-buněk. Preparáty jsou v dalším zkoušení na xenograftech athymových myši pro testování tolerability a nevhodnější koncentrace pro použití u pacientů. Preparát CCI-779 je vysoce lipofilní a proniká hemato-encefalickou bariérou. Je proto nadějný pro terapii velmi maligního nádoru mozku u dětí - primitivního neuroektodermálního tumoru - *medulloblastomu* v kombinaci se chemoterapií. CCI-779 i RAD001 mají totiž spíše cytostatický než cytotoxický účinek a je proto velmi vhodné jich používat se cytotoxickými chemoterapeutiky. CCI-779 má podobně jako rapamycin inhibiční efekt na mTOR a následnou signalizaci, tedy ovlivňuje translaci mRNA a biogenezi ribosomů účinkem na S6K1 a 4E-BP1. Je aplikován orálně i intravenózně. RAD001 byl původně vyvinut jako agens bránící rejekci solidních orgánů po transplantaci.

Jiný analog rapamycinu - **AP23573** je nízkomolekulový inhibitor s antiproliferačním efektem, který byl vyvinut pro intravenózní aplikaci. Na rozdíl od dvou předcházejících derivátů není prekursorem rapamycinu, ale je samostatně aktivní. Byl testován „in vitro“ a „in vivo“ s dobrým inhibičním efektem na buněčných kulturách PTEN-deficientních lidských tumorů jako je karcinom prostaty PC-3 a glioblastom U87MG. Potvrdila to i částečná regrese nádorových elementů u xenograftu tumorových linií glioblastomu, karcinomu prostaty, prsu, plic a tlustého střeva.

V začátku klinického testování jsou preparáty s označením **CCI-779**, **RAD001** a **AP23573**, které působí prostřednictvím molekuly **mTOR** a dalšími členy kaskády. Byla prokázána dobrá terapeutická odpověď u určité skupiny pacientů s glioblastoma multiforme, dále u metastazujícího melanomu, u maligního gliomu, u určitého typu non-hodgkinského lymfomu, u malobuněčného karcinomu plic a u karcinomu ledvin. Objektivní zlepšení nalezeno u 10-20 % těchto pacientů.

Biomarkery mTOR-inhibitorů

Pro výběr vhodných pacientů a pro

testování účinku preparátů působících inhibici následné transdukce signálu po mTOR je *nutné měřit aktivitu klíčových molekul tj. fosforylaci 4E-BP1 a S6K1 kupř. technikou „western blot“.*

Inhibice Aurora-kinas

Členové rodiny Aurora-kinas jsou klíčovými regulátory mitózy. Chyby v mechanismu mitózy bývají zdrojem genomové instability a jsou sdruženy s tumorigenezí. Mitóza je biologický proces, při němž dochází ke kompletní duplikaci a kopii genomu a tím vzniku dvojice dceřinných buněk.

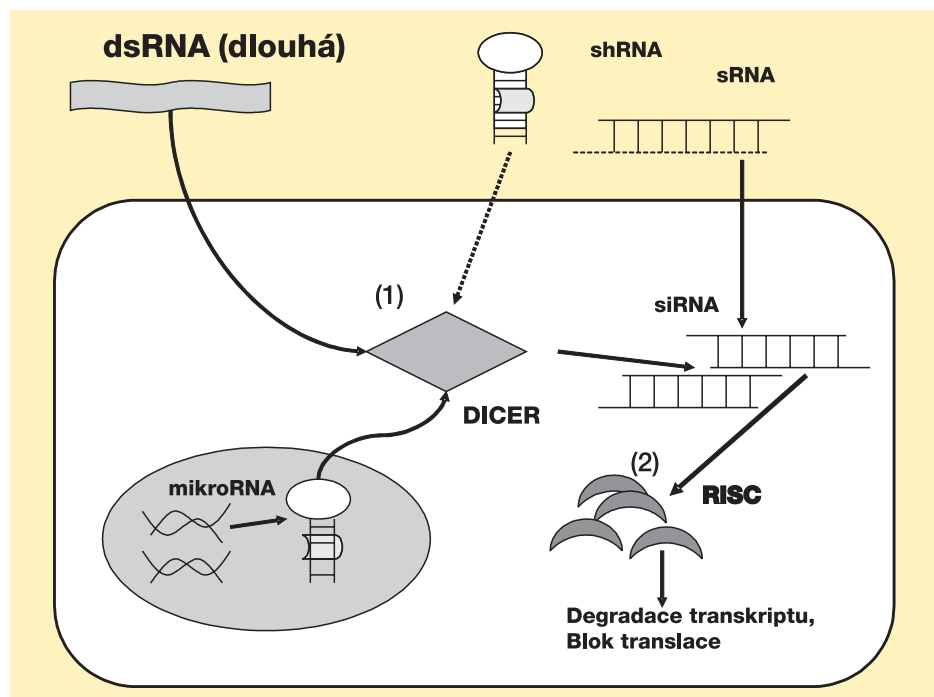
Modulace apoptózy a protisměrné oligonukleotidy

Protisměrné oligonukleotidy jsou uměle připravené krátké nukleotidy (obsahující asi 20 nukleotidů) chemicky modifikované DNA, které mohou vytvořit hybridy se specifickou sekvencí mRNA a zabránit tak translačnímu procesu příslušné mRNA a tím syntéze specifického proteinu. Komplex mRNA s inkorporovaným oligonukleotidem je degradován ribonukleasou H. Aplikovaný oligonukleotid se dostane do buňky endocytózou, pravděpodobně procesem zprostředkovaným určitým receptorem. Oligonukleotid pod názvem *fomivirsen* byl po prvé úspěšně použit při *léčení cytomegalovirové retinitidy* u pacientů s AIDS. Ukázalo se přitom, že cílo-

vou molekulou je H-Ras, c-Raf nebo Bcl-2. Právě onkogen Bcl-2 je nadměrně expri-mován u více než 50 % karcinomů. Je známo, že kóduje antiapoptózy protein, který pak ochrání nádorovou buňku před apoptózou, kterou by mělo navodit podávání tradičních cytotoxických chemoterapeutik, aplikace radioterapie nebo monoklonálních protilátek. Kombinace 18timer-ního protisměrného oligodesoxynukleotidu s názvem *oblimersen-Na* s karboplatinou a etoposidem byla dobře tolerována a měla povzbudivé výsledky při léčení pokročilého malobuněčného karcinomu plic a hematologických malignit. Později se však ukázaly problémy se stabilitou tohoto oligodesoxynukleotidu; proto jsou hledány preparáty stabilnější a výběr jiných nádorů, nezávislých na molekule Bcl-2.

RNA-interference (RNAi)

Jde o mechanismus (evolučně starý), kterým se reguluje exprese genů prostřednictvím krátké interferující RNA (méně než 30 pb) při transkripci genetické informace do vznikající dvoušroubovice RNA (dsRNA), která se vyhne štěpení enzymem RNasou (**Dicer**) a vytvoří tzv. *RNAi-induced Silencing Complex (RISC)*, který nakonec způsobí odštěpení mRNA a její degradaci. Tento mechanismus využívají eukaryontní buňky k eliminaci virových částic z infikovaného genomu. Lze jej také aktivovat pomocí syntetické mikroRNA (miRNA), která



Obr. 4: Schéma RNAi-dráhy

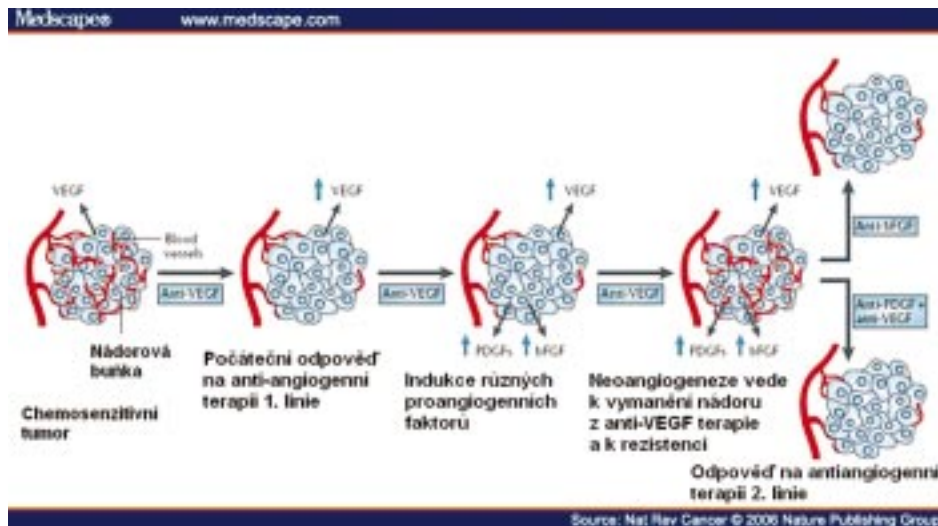
se nazývá „*krátká harpunová RNA*“ (*shRNA*). Aktivace RNAi-dráhy se zkouší i pro potlačení nežádoucí genové exprese u nádorů (obr. 4).

Antiangienní substance u nádorových onemocnění

Angiogeneze, tvorba cévního řečiště, je nezbytná pro další vývoj nádorů od určité velikosti (1-2 mm). Do mechanismu je zapojeno několik signálních drah. Nejznámější je **dráha růstového faktoru pro cévní endotel (VEGF)**. VEGF je ligandem tvořeným nádorovými buňkami a přidruženým stromatem, které působí hlavně na receptor 2 pro VEGF (VEGFR2). Tento receptor má doménu s aktivitou tyrosin-kinasy, která podporuje migraci a proliferaci endotelu. Inhibice neoangiogeneze je možno uskutečnit několika způsoby:

- (1) Inhibicí růstového faktoru pro cévní endotel (VEGF),
- (2) Potlačením tyrosin-proteinkinasové aktivity receptoru pro VEGF (VEGFR) na endotelové buňce,
- (3) Inhibicí proliferace endotelové buňky. Výrazně zvýšená tvorba VEGF je u solidních tumorů pozorována velmi často a patří mezi známky špatné prognózy. Konstituční zvýšení u nádorů se děje stimulací autokrinní nebo parakrinní vlivem řady onkogenů jako je *K-ras*, *p53*, *WT1* a *v-Raf* nebo růstovými faktory *LPA* *PDGF* a *IGF-1* ev. aktivací PI3K-dráhy.

Signalizace VEGF může být inhibována jednak specifickou humanizovanou monoklonální protilátkou vázající se na vazebnou doménu VEGFR (kupř. **bevacizumab**) nebo malomolekulovými inhibitory, které blokují tyrosin-kinasovou aktivitu (**vatalanib**, **sorafenib**, **sunitinib**, **SU6668**, **AG-013736**, **Zactima**). Terapeutické použití nemusí být bez problémů. Po nasazení bevacizumabu sice dochází ke značnému útlumu neovaskularizace, ale za určitou dobu může dojít k nové vaskularizaci navozené sekrecí jiných pro-angienních faktorů (PDGF, bFGF). V tom případě je nutno aplikovat další anti-angienní látky. Ukazuje se (xenografty lidského nádoru mléčné žlázy u myši), že zvýšená exprese VEGFR-1 se děje nejen na endotelových buňkách vaskulatury nádoru, ale též na samotných nádorových buňkách (duální efekt). To by mohlo být využito při



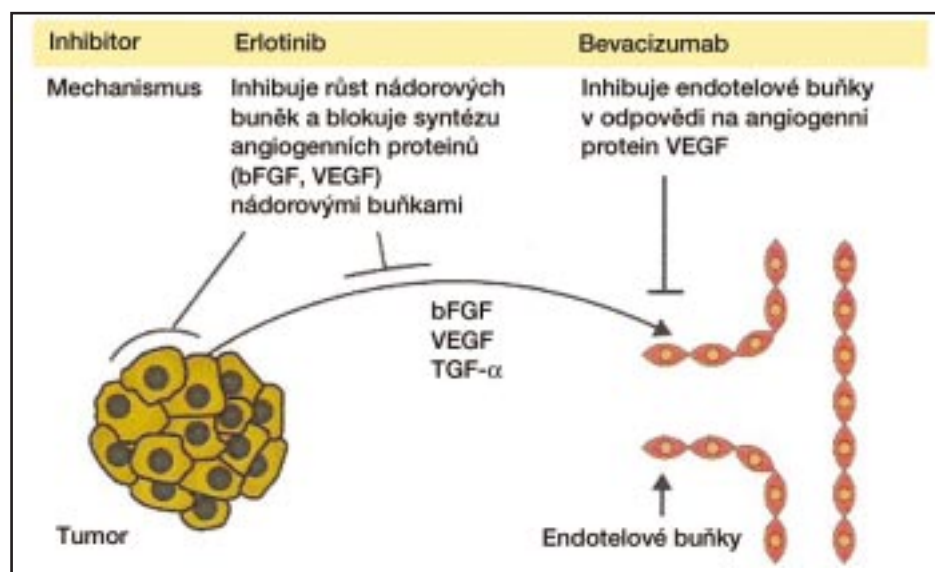
Obr. 5: Hypotetický mechanismus získané rezistence při anti-VEGF terapii. Nádorové buňky produkující VEGF stimulují vaskularizaci rozvíjejícího se tumoru. Takovýto nádor je vhodný pro anti-angienní terapii. Nasazením příslušného léku (bevacizumab) dochází k potlačení neovaskularizace. Nádor se však brání zvýšenou produkcí VEGF nebo tvorbou jiných angienních faktorů jako je bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a růstový faktor odvozený od destiček (PDGF). V nádoru dochází k obnově vaskularizace. Další možnost jejího potlačení spočívá v aplikaci anti-bFGF (kupř. preparát bFGF-TRAP) nebo anti-PDGF a VEGF (kupř. preparát inhibující tyrosin-kinasovou aktivitu jak VEGFR2 tak PDGFR β , kupř. SU6668).

angiogenetické terapii vhodnou anti-VEGFR-protilátkou (obr. 5).

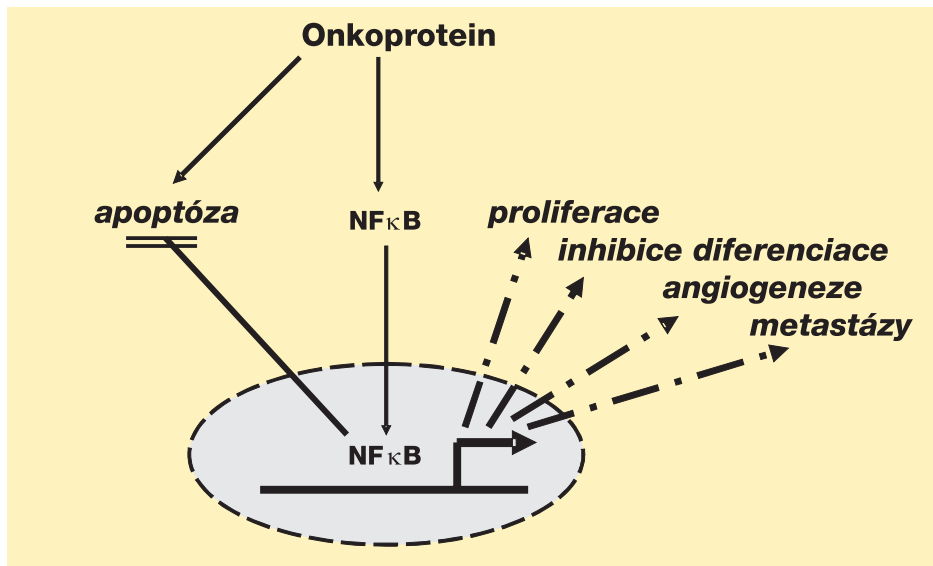
Bevacizumab (rhuMAB-VEGF) je rekombinantní humánní monoklonální protilátka vázající se přímo a neutralizující VEGF, takže mu znemožní vazbu na receptor (VEGFR) a tím zabrání jeho aktivaci na endotelové buňce. Jako monoterapie byl použit při léčení pacientů s metastazujícím karcinomem ledvin, u nichž sice oddálil progresi, ale neprodloužil nijak výrazně dobu přežití ve srovnání s placebem. Naproti tomu mnohem slibnější byl jeho účinek v kombinaci s fluorouracilem/leukovorinem u metastazujícího kolorektálního karcinomu ve srovnání se samotnou che-

moterapií. Podobně byl úspěšný bevacizumab v kombinaci s paclitaxelem u metastazujícího karcinomu prsu.

Capecitabin je sloučenina s malou molekulou, která na rozdíl od protilátky neutralizující svojí vazbou přímo VEGF působí jako inhibitor tyrosin-kinasové aktivity membránového receptoru VEGFR (obsahuje ATP-vazebné místo), a tím zabrání pokračující signalizaci nádorové angiogeneze. Tento preparát podobně jako další mají širší receptorovou specifitu, ale multiplicita proangienních faktorů nasvědčuje tomu, že v monoterapii není jejich účinek dostačující; naopak v kombinaci s jiným druhem protinádorových léků je jejich použití slibné (obr 6.).



Obr. 6: Schéma kombinovaného účinku erlotinibu (inhibitor syntézy angienních proteinů nádorem) s bevacizumabem (inhibuje endotelové buňky před angienním signálem - blokáda VEGF)



Obr. 7: Aktivita navozená NF- κ B v onkogeneze

Vatalanib (PTK787/ZK222584) inhibuje všechny 3 VEGF receptory, ale též PDGFR- β , c-Kit a CSF-1R. Povzbuzující jsou výsledky při zkoušení terapie metastazujícího karcinomu konečnicku a tlustého střeva, rekurentního glioblastomu nebo metastazujícího karcinomu ledvin.

SU11248 a ZD6474 jsou další nově testované multikinasové inhibitory působící na membránové receptory VEGF, které vykazují antiangiogenní a protinádorový účinek. První zkušenosti (II fáze testování) jsou u pacientů s gastrointestinálním stromálním tumorem a u malobuněčného plicního karcinomu.

VTA. Jde o skupinu „malomolekulových“ sloučenin, zatím ve výzkumu, které ovlivňují vaskulaturu přímo (vascular targeting agents = VTA). V porovnání k normální tkáni je architektura cévního řečiště v nádorové tkáni abnormální, chaotická a nepřiměřeně uspořádaná jak vzhledem ve své struktuře tak ve své funkci. Preparáty VTA nepůsobí na rozvoj nádorového řečiště, ale na již vytvořenou vaskulaturu tumoru. Cílovými molekulami jsou prostatický specifický membránový antigen (PSMA), receptory VEGF, fibronectinová doména ED-B, $\alpha_v\beta_3$ -integrin, E-selektin, adhezní molekula pro vaskulární buňky-1 (VCAM-1) a fosfatidylserin.

Zatím jsou zkoumány 2 skupiny VTA:

(1) **Flavon-8-octová kyselina a její deriváty**, kde mechanismus účinku je nepřímý, zprostředkovaný indukcí různých modulátorů imunitního systému jako je NO, serotonin nebo TNF α . Zatím nejslibnější se zdá být **5,6-dimethylxanthen-8-octová kyselina**, která navozuje nekrozu

u řady tumorů (preklinická fáze).

(2) **Látky vázající tubulin** jsou další skupinou - patří sem známá protinádorová chemoterapeutika jako je kolchicin, vinkristin a vinblastin; jejich protinádorový účinek se uplatňuje až v dávce blízké se hranici tolerance. Druhá generace látek „destabilizujících tubulin“ narušuje cévní řečiště nádorové tkáně už v podstatně nižších dávkách (pod hranici maximální tolerance). Patří sem **combrestatin A-4-dinitriumfosfát**, dále preparát **AVE8062A**, **ZD6126** a **ABT-751**.

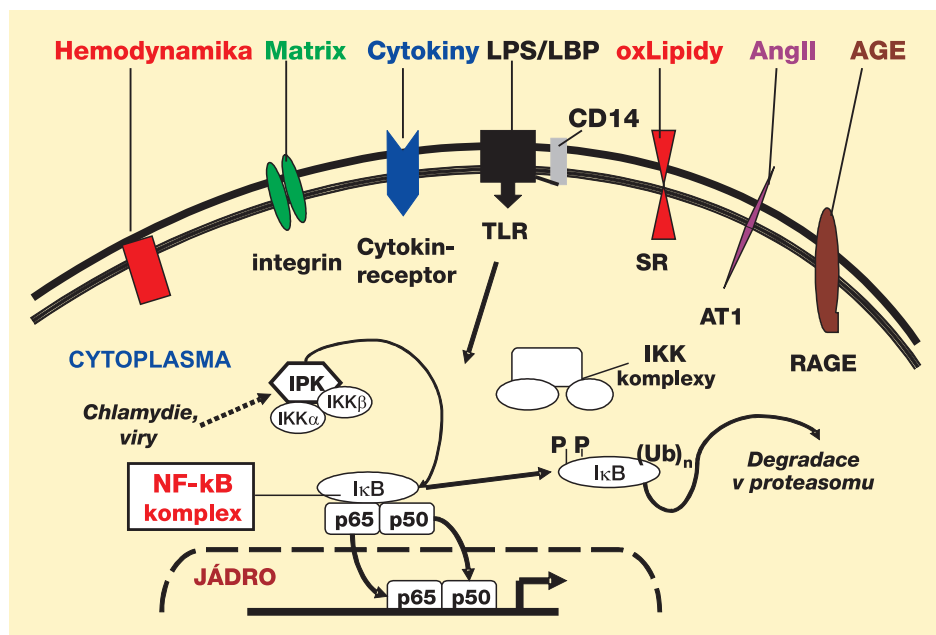
Ubikvitin-proteasomová dráha a její inhibitory

Proteasom je enzymový komplex s aktivitou proteiny široce rozšířený (v rostlin-

né i živočišné říši), který odpovídá za *intracelulární degradaci* poškozených a krátkodobých proteinů, podílí se tak na činnosti regulačních proteinů ovlivňujících buněčný cyklus (cykliny), růst a diferenciaci, čímž se také podílí na rozvoji nádorů nebo ovlivňuje virovou infekci a průběh zánětlivých mechanismů.

Komplex se skládá z cylindrického centrálního jádra (částice 20S) s proteasomovou aktivitou a z částice 19S (regulační), která rozpoznává proteiny určené k degradaci (označené předtím ubikvitinem), a dále z ATPasy hydrolyzující ATP, což je nutné pro rozbalení degradovaného proteinu. Celý proces je označován jako **ubikvitin-proteasomová dráha**. Jeden z klíčových regulačních proteinů degradovaný touto dráhou je **nukleární faktor kappa B (NF- κ B)**. Vazbou na četné sekvence DNA navozuje transkripci onkogenů, tumor-supresorových genů nebo dalších genů kódujících syntézu cytokinů (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α), angiogenetických faktorů (VEGF, adhezních molekul (VCAM 1, ICAM 1), enzymů (COX 2, NO-synthasa), antiapoptozových faktorů (Bcl-2, survivin) nebo proteinů regulujících cyklus buněčného dělení (obr. 7 a 8).

Je-li buňka v klidovém stádiu, aktivita NF- κ B umístěného v cytoplasmě je blokována vazbou se specifickým inhibitem I κ B. Stimulace buňky navozená různými signály (růstové faktory, antigeny, virové částice, radiace, chemoterapeutika apod.) navodí signalizaci, která vede k degradaci



Obr. 8: Centrální úloha NF- κ B v iniciaci genové exprese

IκB proteasomem. Z komplexu uvolněný aktivní NF-κB se tak může přemístit do buněčného jádra, navázat se na specifické sekvence DNA a iniciovat expresi příslušných genů kódujících proteiny ovlivňující dělení, růst, diferenciaci, apoptózu, angiogenezi a další buněčné procesy.

Mutace K-ras onkogenů

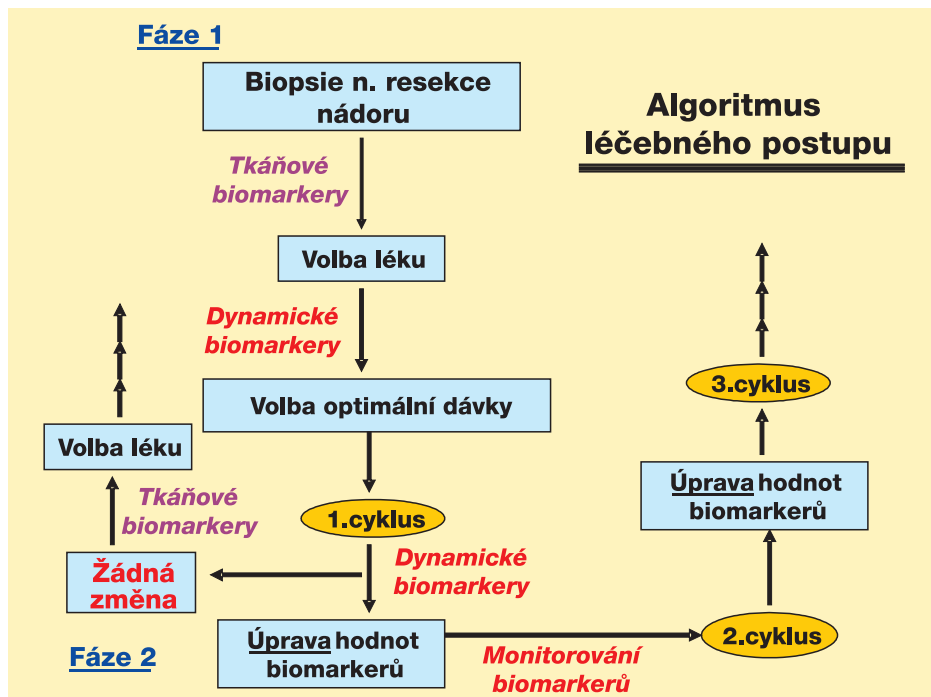
K-ras onkogeny patří k velmi často užívaným genetickým markerům pro odhalení maligních nádorů vyšetřením DNA v biologických tekutinách a krevní plasmě. Alterace K-ras v kodónu 12 a 13 je možno vyšetřit jednak metodou PCR-RLFP (PCR-restriction fragment length polymorphism) nebo rychleji pomocí PCR-MCA (PCR-Melting Curve Analysis). Preoperační a post-operační sledování pozitivitu testu se hodí zejména pacienti s *karcinomem pankreatu*, kdy výskyt těchto mutací v nádorových buňkách je až u 90 %. Vyšetřit je možno pankreatickou tekutinu (66,7 % pozitivních), žluč (33,3 %) nebo plasmu (13,0 %).

Volba a sledování účinnosti protinádorové terapie

Volba a sledování účinnosti protinádorové terapie je bezesporu primárním úkolem po rozpoznání nádorového onemocnění. Zde velmi pomáhají různá přístrojová a laboratorní vyšetření, především pak vyšetření tumorových markerů. Jde o markery, které se objevují v krevní cirkulaci (v moči, výpotku, mozkomíšním moku ...) nebo v tkáni nádoru (bioptické vzorky) (obr. 9).

Biomarkery a charakterizace nádorů podle TNM systému

Pro posouzení závažnosti diagnostikovaného nádorového onemocnění byl v roce 1958 vytvořen a v dalších letech stále zdokonalován tzv. TNM systém, který určuje tzv. „staging“ nádoru určitého pacienta na základě kombinace 3 ukazatelů: **T** (velikost tumoru), **N** (postižení lokálních lymfatických uzlin), **M** (přítomnost metastáz). Kategorizace TNM systému je založena na anatomické (morfologické) bázi. Ukazuje se však, že takovýto způsob posuzování situace pacienta (predikce prognózy, správný výběr terapie, sledování účinnosti terapie) nemusí odpovídat sku-

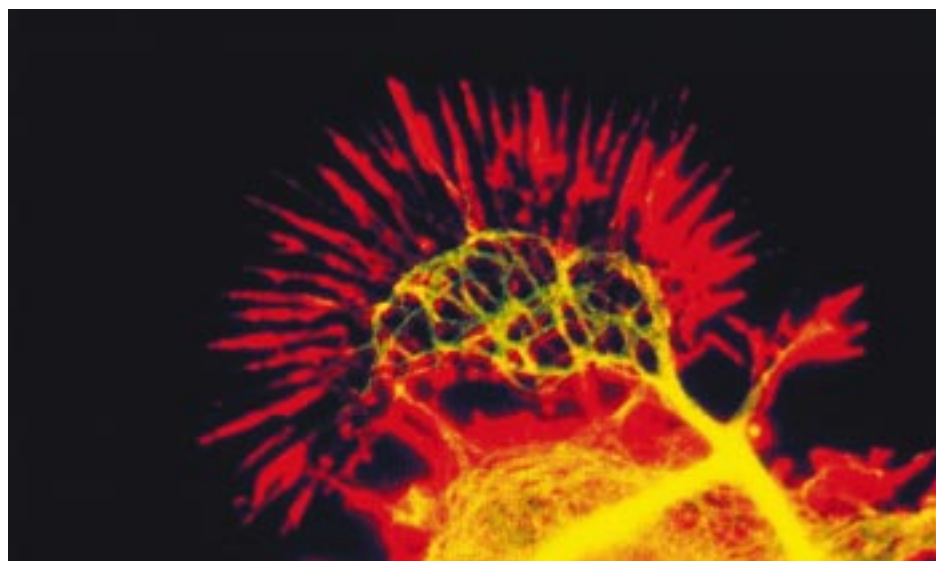


Obr. 9: Model návodu pro racionální použití nádorových markerů (biomarkerů) při protinádorové (anti-angiogenní) terapii. Ve vzorcích nádorové tkáně získané biopsií nebo resekci tumoru je možno imunohistologickým vyšetřením pro-angiogenních markerů (exprese VEGF, bFGF, bFGF, TGFβ1, PDGF β, PDGFR, PLGF, pleiotrofin) získat podklad pro cílenou aplikaci anti-angiogenní terapie. Pomocí „in situ“ imunodetekce markerů charakterizujících cévní endotelium (PECAM neboli CD31 = Platelet-endothelial Cell Adhesion Molecule a SMA = α-smooth muscle actin) je pak možno sledovat změny způsobené remodelací vaskulatury. Pro častější opakované sledování terapeutické odezvy je však třeba využít neinvazivních technik (moderní zobrazovací metody) nebo vyšetření biomarkerů v tělních tekutinách (dynamické biomarkery). Kontrola je nutná po každém cyklu. Při nedostatečné terapeutické odezvě je třeba terapii změnit (second-line therapy) a výsledek opět kontrolovat.

tečnému stavu. Je to jen jeden pohled. Doplnění této charakteristiky o sledování biomarkerů přináší další zpřesnění a v některých případech je dokonce nezbytné.

Biomarkery často nahrazují nebo doplňují tumorovou klasifikaci, „staging“ a „grading“. Příkladem může být význam pozitivitu **CD 20** pro léčení *maligního lymfomu rituximabem*. Nádorová exprese **HER2/neu** podmiňuje úspěšnou terapii *metastazujícího karcinomu prsu trastuzumabem*; stejně jako exprese **receptorů**

pro estrogen a progesteron při antihormonálním léčení (tamoxifen, inhibitory aromatasy) tohoto nádoru. Dalším příkladem je abnormální non-receptorová proteinkinasa **BCR-ABL** při léčení *chronické myeloidní leukemie imatinibem*. Biomarkery jsou též potřebné pro odhalení *idiosynkratické toxicity* kupř. při chemoterapii *leukemie* merkaptopuriny u pacientů s **homozygotní mutací genu pro thiopurin-methyltransferasu (TPMT-gen)**.



Oncology: Insect cells (SF9 cells) overexpressing GFP.