

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

STANOVENÍ FREKVENCE MIKROSATELITOVÉ INSTABILITY A ZTRÁTY HETEROZYGOSITY VE VYBRANÝCH LOKUSECH U SPORADICKÝCH FOREM KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

**Jakub Čáň
Michal Sýkora**

Nový Jičín 2011

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 06. Zdravotnictví

Stanovení frekvence mikrosatelitové instability a ztráty heterozygosity ve vybraných lokusech u sporadických forem kolorektálního karcinomu

Autoři: **Jakub Čáň**
 Michal Sýkora

Škola: **Gymnázium a Střední odborná škola, Nový Jičín,**
 příspěvková organizace, Palackého 50/52

Konsultant: **Ing. Arpád Bóday**

Nový Jičín, 2011

Prohlášení

Prohlašujeme, že jsme svou práci vypracovali samostatně, použili jsme pouze podklady uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V..... dne podpis:

Jakub Čáň

.....
Michal Sýkora

Poděkování

Rádi bychom poděkovali všem, kteří nám pomohli s vypracováním celé naší práce. Nejprve chceme poděkovat Ing. Arpádu Bódayovi za veškerý jeho čas, který věnoval naší přípravě, dále za výborné vedení během vypracovávání jak teoretické, tak praktické části a za konzultaci výsledků. Upřímné díky patří také Mgr. Andrei Ocáskové za důkladnou teoretickou přípravu a za poskytnutí odborné literatury. Dále děkujeme Mgr. Pavle Vaníčkové, Mgr. Magdaleně Dvořákové a Mgr. Barboře Hrušťákové, které nám dávaly cenné metodické rady a Kateřině Horké za veškerou pomoc v laboratoři.

Mgr. Tomáši Sedoníkovi děkujeme za pomoc při úpravě formální stránky práce. Děkujeme Ing. Přemyslu Kramolišovi, který nám zprostředkoval spolupráci s Ing. Arpádem Bódayem.

V neposlední řadě děkujeme také svým rodičům, kteří nás v naší činnosti všemožně podporovali. Na závěr děkujeme společnosti P&R LAB a.s. za umožnění vypracování praktické části této práce, bez jejíž pomoci by tato práce nikdy nevznikla.

Autoři

Abstrakt

Rakovina tlustého střeva a konečníku (kolorektální karcinom, CRC) patří mezi závažná a nejčastěji se vyskytující zhoubná onemocnění ve střední i západní Evropě. CRC je jedna z nejběžnějších příčin úmrtí na rakovinu v západním světě. V České republice je tato choroba nejfrekventovanějším nádorovým onemocněním.

CRC v dnešní době představuje jeden z nejlépe prostudovaných procesů z pohledu molekulární genetiky, který otvírá i možnosti pro výzkum genetických změn dalších onemocnění.

V této práci sledujeme frekvenci výskytu mikrosatelitové instability (MSI) a ztráty heterozygosity (LOH) v daných lokusech v souboru 121 pacientů pocházejícím z Komplexního onkologického centra v Novém Jičíně. MSI a LOH jsou dvě základní předpokládané cesty vzniku sporadických forem CRC. MSI je důsledkem chybné replikace „koktajících“ repetitivních sekvencí v genomu, která je způsobena mutacemi v genech zodpovědných za opravu těchto chyb. LOH způsobuje vyřazení funkce klíčových, zejména tumor-supresorových genů.

Při analýze DNA získané z nádorové a nenádorové tkáně pacientů a po jejich vzájemném porovnání jsme zjistili 32,23% frekvenci výskytu MSI. LOH byla detekována s celkovou frekvencí 26,45%. Nejvíce LOH bylo nalezeno v lokusu D5S346 (14,88%) a dále v lokusech D18S35 (9,92%), D5S299 (9,09%), D17S250 (2,48%) a D2S123 (0,83%).

Získané výsledky víceméně korespondují s výsledky publikovanými v odborné literatuře. Rozdíly mezi našimi a publikovanými výsledky kromě objektivních skutečností vysvětlujeme velikostí analysovaného souboru a citlivostí používaných metod.

Naše výsledky budou dále využívány a doplněny dalšími analýzami v Laboratoři molekulární biologie P&R LAB a.s., kde naše práce vznikla. Laboratoř molekulární biologie P&R LAB a.s. je součástí Komplexního onkologického centra v Novém Jičíně, kde je problematika CRC řešena nejenom rutinně, ale i výzkumně.

Klíčová slova: rakovina; tlusté střevo; sporadický kolorektální karcinom; mikrosatelitová instabilita; ztráta heterozygosity; Fearon-Vogelsteinův model.

Obsah

1.	Úvod.....	6
2.	Teoretická část.....	8
2.1.	Anatomie, histologie a fyziologie tlustého střeva a konečníku	8
2.2.	Biologické aspekty vzniku rakoviny	9
2.2.1.	Charakteristické rysy rakoviny	9
2.2.2.	Mutace	11
2.2.3.	Genetika nádorů	11
2.2.4.	Polymorfismy	11
2.2.5.	Protoonkogeny	12
2.2.6.	Tumor-supresorové geny	12
2.3.	Karcinom tlustého střeva a konečníku	13
2.3.1.	Epidemiologie CRC.....	13
2.3.2.	Vliv prostředí na vznik CRC.....	15
2.3.3.	Morfologie a klinická stadia	16
2.3.4.	Prevence, screening a kontrola rakoviny	16
2.3.5.	Terapie karcinomu tlustého střeva	17
2.3.6.	Dědičnost CRC.....	17
2.3.7.	Vznik kolorektálního karcinomu - Fearon-Vogelsteinův model	19
2.3.8.	Krátký přehled genů souvisejících se vznikem CRC	22
3.	Metodika a materiál	25
3.1.	Soubor pacientů	25
3.2.	Používané metody.....	25
3.3.	Sledované vysoce polymorfnní lokusy	25
3.4.	Způsob hodnocení	26
3.5.	Isolace DNA z tkáně	26
3.6.	Isolace genomické DNA z krve	27
3.7.	Polymerasová řetězová reakce vybraných vysoce polymorfnních lokusů....	28
3.7.1.	Polymerasová řetězová reakce s neznačenými primery	28
3.7.2.	Polymerasová řetězová reakce se značeným F primerem pro fragmentační analysu	29
3.8.	Separace a analysa PCR produktů	30
3.8.1.	Separace neznačených PCR produktů na DNA čipech - Agilent DNA 1000 Assay protokol	30
3.8.2.	Separace neznačených PCR produktů v denturační polyakrylamidové gelové elektroforese (PAGE).....	31
3.8.3.	Analysa značených PCR produktů	32
3.9.	Výsledky.....	33
4.	Diskuse.....	41
5.	Závěr	43
6.	Použitá literatura.....	45
7.	Seznam zkratek.....	49
8.	Seznam obrázků.....	50
9.	Seznam grafů	50
10.	Seznam tabulek.....	50

1. Úvod

Po nemocích kardiovaskulárního systému je ve vyspělých zemích rakovina druhou nejčastější příčinou úmrtí. Onemocnění postihne přibližně každého třetího člověka. Z důvodu vysoké a stále zvyšující frekvence a závažnosti patří onkologická onemocnění mezi největší zdravotní problémy.

Zvyšující se frekvence nádorových onemocnění může být na první pohled alarmující. Rozvoj medicíny významně prodlužuje věk populace, což s sebou nese větší nároky pro organismus na zachování genetické stability i jeho delší vystavení nežádoucím dopadům prostředí.

Vlivem chyb během replikace DNA dochází v somatických buňkách ke kumulaci mutací. S prodlužujícím se věkem mohou tyto mutace nabýt takového množství, že jejich kombinace může vyústit ve vznik nádorového onemocnění. Při frekvenci chyb jen při samotné replikaci DNA 10^{-10} na lokus na dělení a odhadem 10^{15} buněčných dělení v celém organismu za život jsou výsledkem nepřesností v replikaci tisíce mutací v genomu každé buňky. Připočítáme-li k tomu vznik mutací působením mutagenů (pocházejících z okolí) lze konstatovat, že zátěž organismu je vskutku obrovská.

Vznik nádoru je tedy výsledkem akumulace rozdílných genetických a epigenetických změn, které se objevují na úrovni chromosomů a DNA, což se potom odráží ve změněném expresním profilu nádorové buňky. Tento víceetapový proces je charakterisován inaktivací tumor-supresorů, aktivací protoonkogenů prostřednictvím mutací, ztrátou alel nebo deficiencí genů opravného mechanismu.

Zrození života a jeho zánik jsou vzájemně se doplňující přirozené procesy. Jakmile se jednou na tento svět narodíme, máme předurčeno, že z něj budeme muset jednou i odejít. Otázkou zůstává, kdy to nastane a za jakých okolností to proběhne.

Molekulárně genetická diagnostika se na jedné straně stává nedílnou součástí medicíny a na druhé prohlubuje problémy se zachováním lékařského tajemství a vyvolává významné etické otázky, někdy i dokonce paniku ve společnosti. Nicméně získané molekulárně genetické a molekulárně biologické poznatky přinesly výrazný pokrok a nelze pochybovat o tom, že obrovská investice do základního a aplikovaného výzkumu nádorů se vyplácí.

Tato práce si klade za cíl odhalit, jakou mírou zasahuje poškození MMR systému sporadické formy CRC a jaký je podíl ztráty heterozygosity na tomto procesu tumorigenese. K realizaci využíváme metody molekulární genetiky na analýsu

vybraných osmi vysoce polymorfních lokusů v genomu, ve kterých budeme sledovat a vzájemně porovnávat genotypy nádorové a nenádorové tkáně.

2. Teoretická část

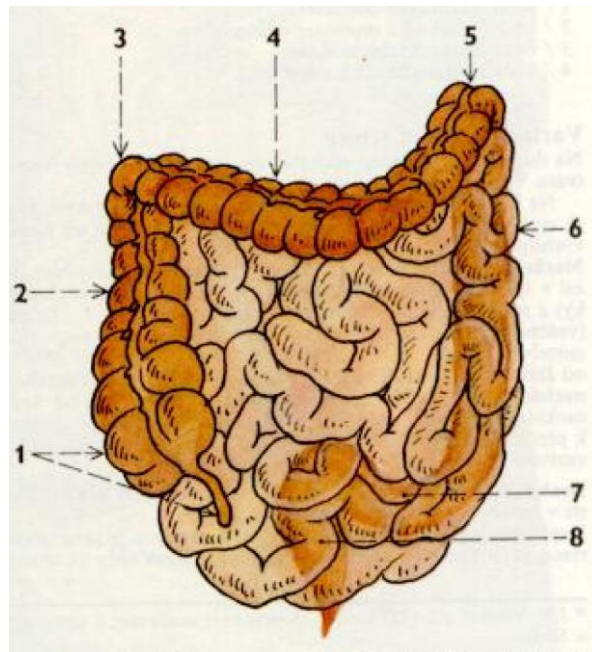
2.1. Anatomie, histologie a fyziologie tlustého střeva a konečníku

Tlusté střevo je poslední úsek trávicí trubice navazující na poslední část tenkého střeva, ileum. Délka se pohybuje kolem 1,2 - 1,5 m, šířka cca 4 - 7 cm. V tlustém střevě za sebou následují: **caecum** (střevo slepé), **colon** (tračník) a **rectum** (konečník).

Colon se dělí na tyto části: **colon ascendens** (tračník vzestupný), **colon transversum** (tračník příčný), **colon descendens** (tračník sestupný) a **colon sigmoideum** (esovitá klička). Mezi úseky tračníku jsou typická ohbí: **flexura coli dextra** (pravé ohbí) a **flexura coli sinistra** (levé ohbí).

Poslední úsek střeva v malé pánvi vyúsťuje navenek otvorem zvaným **anus** (řiť).

Obrázek 1 - tlusté střevo a jeho poloha vůči tenkému střevu



- 1) caecum s appendixem
- 2) colon ascendens
- 3) flexura coli dextra
- 4) colon transversum
- 5) flexura coli sinistra
- 6) colon descendens
- 7) colon sigmoideum
- 8) rectum

Stěna tlustého střeva se skládá ze 4 vrstev charakteristických pro trávicí trubici: **sliznice, podslizniční vazivo, svalová vrstva a povrchová vnější vrstva**. Sliznice tlustého střeva je bledá, žlutavá, nenese klky a je kryta jednovrstevným cylindrickým epitelem. Jednotlivé buňky sliznice jsou **enterocyty, pohárkové buňky, M-buňky, chomáčkové buňky, nediferencované (kmenové) buňky a endokrinní buňky**. (ČIHÁK, 1988)

Colon má dvě hlavní funkce, a to **reservoárovou** - skladování stolice až do defekace, a **resorpční** - vstřebávání vody, sodných kationtů a dalších minerálů. Do tlustého střeva se denně dostává asi 1,5 l tekuté tráveniny, jež je koncentrována a za spolupůsobení střevních mikroorganismů přeměněna na stolicí s obsahem pouze 60 - 120 ml vody.

Stolice je normálně ze 75% tvořena vodou. Zbytek obsahuje 10 - 20% anorganických látek, kolem 30% mrtvých bakterií, 2 - 3% bílkovin, 10 - 20% tuků z bakterií a oloupaných epitheliálních buněk, nerozloženou hrubou vlákninu z potravy a část trávicích šťáv.

Bakterie štěpí poměrně velké množství rostlinné vlákniny a jejich aktivitou vznikají i některé vitaminy (riboflavin, thiamin, kobalamin, vitamin K). Při životních pochodech vznikají jejich činnostmi některé plyny, jako je oxid uhličitý, vodík, methan, sulfan.

Doba **střevní pasáže** je výrazně ovlivněna složením stravy. Přechod nestrávených částic od ileocaekální chlopně po rectum trvá obvykle 2 - 3 dny. U Evropanů s minimálním podílem nestravitelných složek v potravě (celulosa, hemicelulosa, lignin, pektiny apod.) i déle než uvedený průměr a naopak u afrických vesničanů, kde vláknina tvoří většinu objemu potravy, jen okolo 36 hodin. S tím souvisí i více než čtyřnásobná hmotnost jejich stolice, která dosahuje až 480 g. (GANONG, 1997, TROJAN et al., 2003)

2.2. Biologické aspekty vzniku rakoviny

2.2.1. Charakteristické rysy rakoviny

Rakovinu lze definovat jako soubor příznaků, jejichž společným znakem je nekontrolovaný růst buněk, který se vymyká koordinačním dějům v živém organismu. Tento proces, tedy přeměna zdravé somatické buňky v nádorovou, se označuje jako **neoplastická transformace**.

Přestože mnohé detaily vzniku rakoviny zůstávají nejasné, základním poznatkem je to, že nádory jsou výsledkem genetických poruch. Ty vznikají **kumulací mutací**

v protoonkogenech, tumor-supresorových genech (viz příslušné kapitoly) a celkově narušením epigenetické rovnováhy.

Obecně se jako **nádor** (či tumor, neoplasma nebo též novotvar) označuje nová a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která se dělí nekontrolovaným způsobem. Buňky **primárního nádoru** se šíří do okolí a utlačují sousední tkáně, prorůstají do cévního a mízního oběhu a zakládají nová ložiska (**metastase, sekundární nádory**) ve zdravých tkáních a orgánech, jež jsou ve více než 90% případů příčinou smrti pacienta postiženého tvorbou maligních nádorů.

Co do schopnosti metastasovat - infiltrovat se do jiné tkáně a proliferovat v ní za tvorby nového nádoru - se rozlišují **nádory benigní**, tedy nezhoubné, které nemetastasují, jsou charakteristické pomalým růstem potlačujícím rozšiřování okolní tkáně, a dále **nádory maligní**, zhoubné, které se v těle šíří metastasí a jsou výsledkem řady po sobě jdoucích mutací dávajících za vznik klonální expansi buněk s různými mutacemi. (ROSYPAL, 2002)

Douglas Hanahan a Robert Weinberg popsali **šest charakteristických znaků drah**, které vedou k malignímu nádoru.

1. Nádorové buňky získávají **soběstačnost v signalisacích**, které stimulují dělení a růst. V krajním případě může buňka vytvořit pozitivní regulační smyčku tak, že reaguje na růstový signál, který sama produkuje.
2. V normálních buňkách jsou faktory stimulace a inhibice buněčného růstu v rovnováze, což umožňuje regulovat buněčný růst. V nádorových buňkách **stimulační dráhy převládají**.
3. Nádorové buňky se dokáží vyhnout programované buněčné smrti, **apoptose** (viz Gen *TP53*).
4. Nádorové buňky získávají **neomezený replikační potenciál**. Při každém buněčném dělení dochází ke zkracování konců chromosomů (telomer), jehož důsledkem je omezení počtu dělení. Aktivita enzymu telomerasy, reversní transkriptasy zodpovědné za prodlužování telomer, u diferencovaných buněk klesá. Nádorové buňky se dokáží omezenému počtu dělení vyhnout tím, že v nich dojde genovou nebo chromosomovou mutací k obnovení telomerasové aktivity a tudíž k zisku neomezeného replikačního potenciálu.
5. Nádorové buňky vyvinou způsob jak se vyživovat. Indukce růstu krevních cévek nádorovými buňkami nazývaná **angiogeneze** je klíčovým krokem progresu do maligního nádoru. V nádorové tkáni je rovnováha indukujících a inhibujících faktorů vychýlena na stranu prvních jmenovaných.
6. Nádorové buňky získají schopnost **pronikat do ostatních tkání** (metastasovat)

a tím založit nový, trvalý a nakonec někdy až lethální vztah s místními buňkami. (SNUSTAD et al., 2009)

2.2.2. Mutace

Mutace je definována jako jakákoliv změna v nukleotidové sekvenci nebo v uspořádání DNA. (NUSSBAUM et al., 2004) Jedná se o náhodnou změnu. Pokud mutace vznikne v zárodečných buňkách, přináší do genofondu nové alely a je zdrojem genetické variability v populaci. Z hlediska populačně genetického mohou být mutace **výhodné**, **neutrální** nebo **škodlivé**. Z hlediska jedince způsobují škodlivé mutace zdravotní potíže a mohou být do konce i lethální. (BÓDAY et al., 2009a)

Z hlediska širšího mutace můžeme dělit na **genomové**, které postihují počet chromosomů, **chromosomové**, které mění strukturu jednotlivých chromosomů, a **genové**, které pozměňují jednotlivé geny. (NUSSBAUM et al., 2004)

Pokud vznikne mutace v zárodečných buňkách, mluvíme o **zárodečné (germinální)** mutaci. V případě, že se tato mutace přenese na potomka a není lethální před dovršením fertilního věku (nebo neomezuje reprodukci), stává se dědičnou.

Mutace vzniklé v jakékoli jiné buňce než v zárodečné jsou **somatické** a nejsou dědičné. Tyto sporadické mutace jsou vzácně spontánní, většinou indukované vnějšími faktory - karcinogeny. (ROSYPAL, 2002)

2.2.3. Genetika nádorů

Z genetického hlediska rozlišujeme nádory **dědičné** (cca 5% všech nádorů) a **sporadické** (95% případů). Sporadické nádory se objevují v pokročilejším věku a vznikají v těch místech v organismu, jako např. epitheliální tkáň, kde dochází k časté náhradě buněk a tudíž k častému dělení buněk a replikaci DNA.

Zděděné germinální mutace mohou přispívat ke vzniku dědičných (**hereditárních**) forem rakoviny a dávají tak genetickou dominantní dědičnou predisposici ke vzniku nádoru. Mutace somatické, které mohou ovlivnit vznik sporadických (**nehereditárních**) forem rakoviny, způsobují větší procento všech druhů rakovin. (ROSYPAL, 2002)

2.2.4. Polymorfismy

V každém úseku nekódující sekvence DNA dlouhém přibližně 1000 párů basí se najde průměrně jen jeden pár basí, který se mezi dvěma příslušníky populace liší. Různé varianty určité sekvence DNA na určitém lokusu jsou nazývány alely.

Nachází-li se jedna alela na více než 1% chromosomů v celé populaci, tvoří

genetický **polymorfismus**. Alely s frekvencí nižší než 1% v populaci jsou tzv. vzácné varianty.

Polymorfismy v intronech, tj. nekódujících sekvencích, nemají vliv na funkčnost žádného genu, ale polymorfismy v kódujících sekvencích (exonech) mohou vést k ostře rozdílným fenotypům.

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP - single nucleotide polymorphism) jsou odlišnosti dvou alel v jednom nukleotidu. Podskupinou SNP je **RFLP** (restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restrikčních fragmentů), kde přítomnost SNP ruší nebo vytváří štěpné místo pro danou restrikční endonukleasu.

Polymorfismy mikrosatelitů jsou krátké variabilní oddíly o 2 - 4 basích opakujících se 2 - 10krát za sebou. Každá alela je definovaná číslem repetice.

Polymorfismy minisatelitů, také nazývané **VNTR** (variable number of tandem repeats), jsou tvořeny tandemovou insercí několika kopií sekvence DNA o délce 20 až 500 párů basí. (NUSSBAUM et al., 2004, PASSARGE, 2007)

2.2.5. Protoonkogeny

Protoonkogen je buněčný strukturní gen, jehož produkt, protoonkoprotein, se funkčně účastní na stimulaci buněčného dělení a diferenciaci buňky. Ztráta původní funkce v těchto genech se nazývá **aktivace protoonkogenu** a může k ní dojít **mutací** (genovou, chromosomovou), **amplifikací** genu nebo **inserční mutagenesí** v důsledku inserce viru. Tato alelická varianta protoonkogenu se nazývá **onkogen** a jeho produkt onkoprotein. Onkogen působí dominantně, tudíž jedna mutovaná alela může přivést buňku blíže k maligní transformaci. Tyto mutace až na výjimky nevznikají v zárodečných buňkách a tudíž nejsou dědičné. (ROSYPAL, 2002)

2.2.6. Tumor-supresorové geny

Tumor-supresorové geny (též antionkogeny) kódují proteiny, jejichž funkcí je inhibovat nebo brzdit buněčný růst a dělení. Poškození tumor-supresorových genů vyřazuje jeden nebo několik kontrolních bodů buněčného cyklu.

Mutace supresoru mohou nastat v somatických i v zárodečných buňkách. Na rozdíl od protoonkogenů, mutace v jedné alele tumor-supresorového genu nemá plný vliv na změnu fenotypu, má tedy recesivní účinek. Jedna mutace, ať už zděděná či somatická, dává pouze predisposici k nádorové transformaci. Kompletní inaktivace supresoru je realizovaná **ztrátou heterozygosity** (loss of heterozygosity - LOH), **hypermethylací** původní zdravé alely nebo jinými vzácnými zásahy. Tyto geny tedy

přispívají k malignitě až prostřednictvím ztráty funkce obou alel určitého genu. (ROSYPAL, 2002)

Tumor-supresory dávají vzniknout stejným nebo podobným fenotypům různými genetickými mechanismy, rozdělují se proto na tzv. **gatekeepers** - přímo zapojeny do regulace buněčného cyklu nebo kontaktní inhibice růstu (např. gen *APC*, *TP53*) a **caretakers**. Ty se zapojují do opravy poškození DNA a udržují integritu genomu (např. *hMSH2* a *hMLH1*). Vznik hereditárních i nehereditárních nádorových onemocnění vysvětluje Knudsonova hypotéza dvou zásahů. (NUSSBAUM et al., 2004)

2.3. Karcinom tlustého střeva a konečníku

2.3.1. Epidemiologie CRC

Kolorektální karcinom se považuje za závažné civilizační onemocnění. Celosvětová incidence je rozdílná v závislosti na vyspělosti dané země, např. Nigérie 3,4 onemocnění na 100 000 obyvatel, USA 35,8 na 100 000 obyvatel. Z dosavadních studií jednoznačně vyplývá výrazně vyšší výskyt tohoto onemocnění ve vyspělých státech, což může být spojeno se specifickými stravovacími návyky (viz Vliv prostředí na vznik CRC), stejně jako s nedostatkem pohybové aktivity, sedavým způsobem života, obesitou a kouřením. (KYSELOVÁ & BÓDAY, 2009, VYZULA 2009)

V naší populaci je CRC nejčastějším zhoubným onemocněním trávicího traktu a současně nejfrekventovanější typem nádorového bujení u obou pohlaví. Incidence tohoto onemocnění se v ČR od roku 1977 trvale zvyšovala, od roku 2003 stagnuje a mortalita dokonce mírně klesá (Obrázek 2, DUŠEK et al., 2007), i přesto jsou Češi na předních místech ve světových žebříčcích: u mužů na druhém místě (Obrázek 3, DUŠEK, et al., 2007) a na sedmém místě u žen (Obrázek 4, DUŠEK et al., 2007).

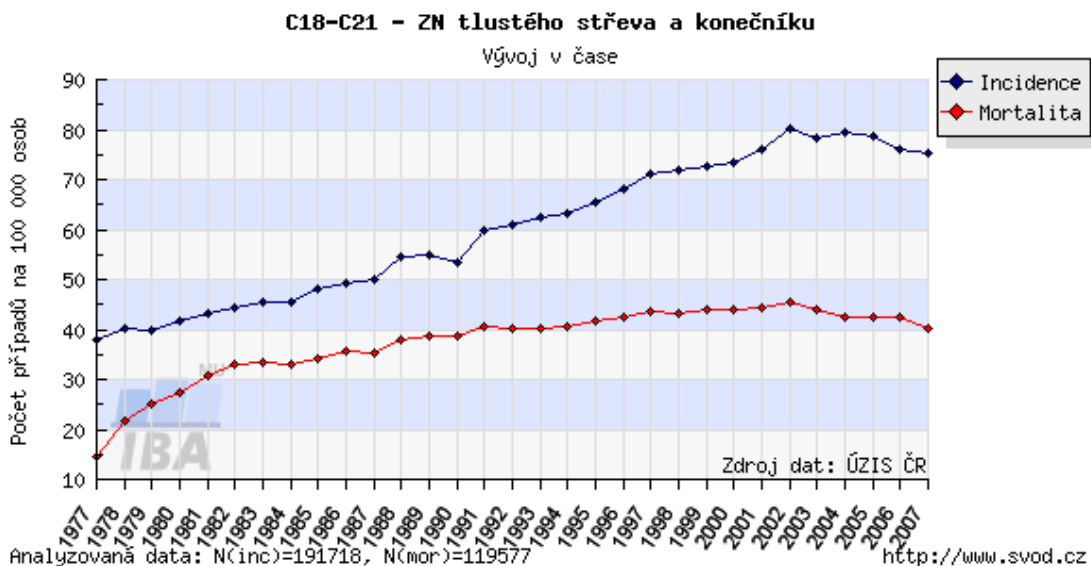
U mužů se vyskytuje častěji než u žen, a to obvykle po překročení 70. roku života. V incidenci lze také pozorovat jisté regionální rozdíly. Nejvyšší výskyt je zaznamenán v kraji Plzeňském a Jihočeském (Obrázek 5, DUŠEK et al., 2007). (VYZULA, 2009)

Obecně se dá říci, že riziko vzniku nádoru přirozeně koreluje s rostoucím věkem, protože se hromadí různé genetické abnormality, stárne imunitní systém, roste celkové opotřebenění a klesají celkové rezervy organismu. Svoji roli hrají jak hereditární predispozice (viz dále), tak i vlivy prostředí. (DIENSTBIER & STÁHALOVÁ, 2009, HOLCÁTOVÁ, 2011)

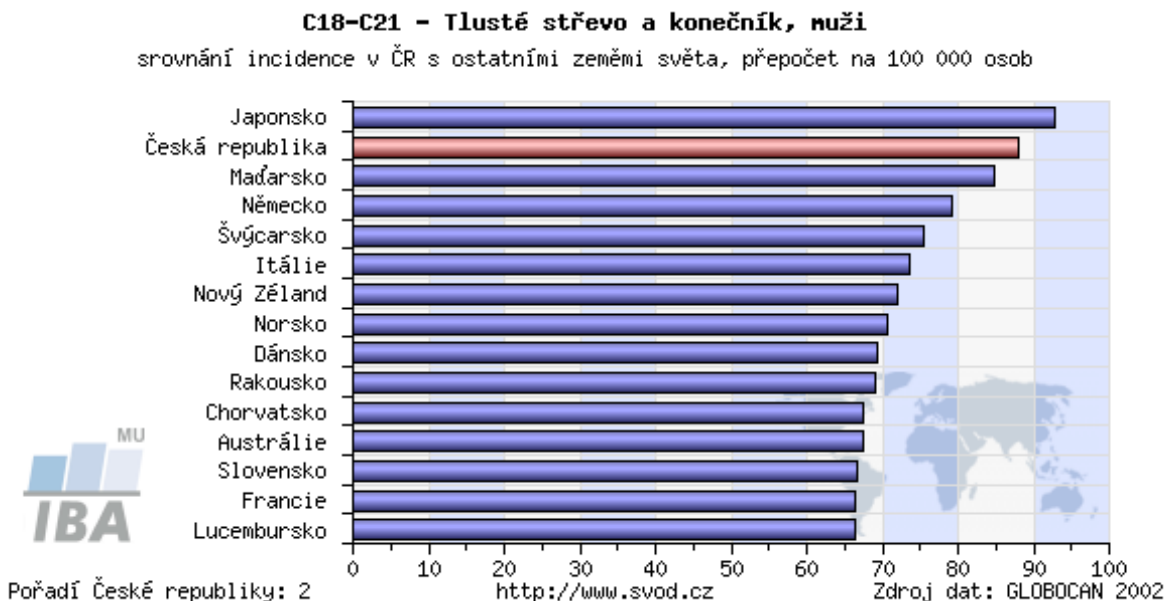
Cesta vedoucí ke vzniku CRC je dlouhá a mimo exogenních faktorů, jejichž

podíl na vzniku nádorových onemocnění obecně může být až 50%, je také ovlivněná „genetickým pozadím“ organismu, čímž myslíme např. geny kódující enzymy působící během metabolismu xenobiotik (enzymy detoxikační fáze I a II), kritickou individuální kapacitu DNA opravy apod. Uplatňují se zde polymorfismy i mutace, zvyšující, či snižující aktivitu daných enzymů. (BÓDAY, 2011)

Obrázek 2 - časový vývoj incidence a mortality CRC v ČR



Obrázek 3 - srovnání incidence v ČR s ostatními zeměmi světa



potenciální karcinogeny a snižuje dobu působení karcinogenu na sliznici. Za možný protektivní faktor se považuje konzumace rybího masa díky přítomnosti mastných kyselin v jejich tuku.

Nadměrné požívání alkoholu usnadňuje transport karcinogenů do kmenových buněk.

Dalšími faktory zvyšujícími riziko vzniku CRC mohou být sedavý způsob života a kouření cigaret. Výzkumy poukazují na významné zvýšení rizika při kouření více než 35 balíčků cigaret/rok u mužů. (DIENSTBIER & STÁHALOVÁ, 2009, VYZULA, 2009)

2.3.3. Morfologie a klinická stadia

Přibližně 90 - 95% maligních tumorů trávicího traktu vychází ze střevních nebo žaludečních epithelových buněk (karcinomy). Zhoubné nádory tračníku jsou odvozeny téměř výlučně z jeho žlázového epithelu (adenokarcinomy) a vznikají v průběhu dlouhého časového období 10 - 15 let. (JUNQUEIRA et al., 1997, ADAM et al., 2010) Malé procento vzniká bez prokazatelného stadia adenomu *de novo* kancerogenesí. Kolorektální karcinomy mají tvar polyposních útvarů, které v různé míře infiltrují střevní stěnu a případně přilehlé okolí. Histologický grading adenokarcinomů rozlišuje 3 kategorie: dobře, středně a nediferencované karcinomy, což má prognostický význam. (ADAM et al., 2010)

2.3.4. Prevence, screening a kontrola rakoviny

Primární prevence je snížení risikových vlivů prostředí, změna životního stylu a je otázkou dlouhodobé intervence, převážně v populaci dětské a dorostové.

Sekundární prevence kolorektálního karcinomu je cílena na populaci asymptomatických jedinců, u kterých vzhledem k věku stoupá riziko vzniku tohoto nádorového onemocnění. Ve většině zemí, včetně České republiky, se ve screeningu používá **vyšetření okultního krvácení ve stolici** (TOKS). Tato metoda je populací dobře akceptována, levná a snadno proveditelná. Jedinci s pozitivním nálezem absolvují **kolonoskopické** vyšetření k určení etiologie krevních ztrát.

Dalšími metodami jsou **flexibilní sigmoideoskopie** (FSS) a **virtuální kolografie**, která využívá moderních zobrazovacích metod - počítačové tomografie a magnetické resonance. (ZAVORAL, 2007)

Terciární prevence si klade za cíl zachytit případný návrat nádorového onemocnění po primární léčbě, dispensarisace pacientů. (DIENSTBIER & STÁHALOVÁ, 2009)

2.3.5. Terapie karcinomu tlustého střeva

Pro kolorektální karcinom je základem léčby chirurgická resekce samotného nádoru a případných solitárních metastas. Totéž platí i pro léčbu recidivy nádoru. Chemoterapie má místo v adjuvantní a v paliativní léčbě. Použití radioterapie je omezeno na oblast rekta.

Chemoterapie

Již od roku 1957 je pilířem chemoterapie 5-fluorouracil (5FU). Chemoterapie 5-fluorouracilem je velmi dobře tolerovaná. Spektrum a intenzita nežádoucích účinků závisí na způsobu aplikace, což souvisí s odlišným mechanismem účinku.

Biologická léčba

V léčbě nádorů exprimujících EGFR je indikována léčba chemoterapií v kombinaci s cetuximabem, což je chimérická monoklonální protilátka zaměřená proti receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR). Nadprodukce EGFR je popisována ve více než 85% nádorů tlustého střeva a konečníku. Cetuximab blokuje a inhibuje funkci EGFR receptoru, čímž blokuje buněčnou proliferaci a indukuje apoptosu. V současné době se jako predikátor resistance na léčbu cetuximabem jeví přítomnost mutace *K-Ras*. (ADAM, 2010)

2.3.6. Dědičnost CRC

Většina karcinomů tlustého střeva (75-80%) patří mezi sporadické formy, které se objevují v přibližně 90% případů po 50. roce věku.

Asi u 25% kolorektálních karcinomů lze vysledovat výskyt v rodině. **Familiální forma** se vyskytuje s frekvencí 15-20% a svou roli zde hrají i stejné návyky v rámci rodiny - např. výživa, kouření a pohyb. Pouze asi 5% kolorektálních karcinomů je **hereditárních**, jsou tedy způsobeny vrozenou predisposicí ve formě dědičně přenášené genové poruchy. Charakteristický je nízký věk pacienta v době diagnózy (pod 50 let).

Dosud byly podrobně popsány dva hlavní syndromy s predisposicí ke vzniku karcinomu tlustého střeva: **familiální adenomatosní polyposa (FAP)**, **Lynchův syndrom (HNPCC)** a několik dalších vzácných syndromů. (BÓDAY, 2011, KYSELOVÁ & BÓDAY, 2009)

Familiální adenomatosní polyposa (FAP), MYH asociovaná polyposa (MAP)

FAP je **autosomálně dominantní** onemocnění s frekvencí 1/7000 narozených. Projevuje se výskytem několika set až tisíců **adenomatosních polypů** podél tlustého střeva, které se začínají tvořit mezi 40. - 50. rokem věku jedince. U nemocných s FAP se objevují nejen nádory tlustého střeva a konečníku, ale i kraniofaciální osteomy, epidermální cysty, gastroduodenální polyposy, nádory mozku, hepatoblastomy a sarkomy. (EELES et al., 2004) Jestliže nejsou včas odstraněny, je zde téměř 100% pravděpodobnost, že se posléze jeden z nich vyvine v maligní tumor.

Příčinou FAP je zděděná mutace tumor-supresorového genu *APC* (viz Gen *APC*). Druhá mutace vznikne somaticky.

Příznaky podobné FAP způsobuje i zárodečná mutace v genu *MYH* (viz Gen *MYH*), pak se toto onemocnění nazývá *MYH* asociovaná polyposa (MAP). Nádory postižených pacientů vykazují somatickou transversí způsobenou 8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosinem (8-oxoG) v genu *APC*, jenž se tímto zásahem stává nefunkční. To vysvětluje příznaky podobné FAP. (NUSSBAUM et al., 2004, ROSYPAL, 2002, SNUSTAD et al., 2009, ŠTEKROVÁ et al., 2006)

Hereditární nepolyposní kolorektální karcinom (HNPCC)

Lynchův syndrom je nejčastější hereditární predisposicí pro vznik karcinomu tlustého střeva, nemocní s HNPCC tvoří asi 2% ze všech nemocných s kolorektálním tumorem. Průměrný věk nemocných v době diagnózy CRC je 42 - 44 let, tedy o dvacet let méně než u běžné populace.

Karcinomu nepředchází mnohočetná polyposa jako u FAP. Kromě toho bývá u pacientů pozitivních na HNPCC častější výskyt nádorů endometria, žaludku, hepatobiliárního traktu, tenkého střeva, pankreatu, ovarií, ureteru, ledvinné pánvičky a mozku. (EELES, 2004)

Dnes známe několik genů, jež jsou zodpovědné za vznik HNPCC. Jsou to *hMSH2* (lokalisace 2p16), *hMLH1* (3p21), *hMSH6* (2p16), *hPMS2* (7q22) a *hPMS1* (2q31). Všechny tyto geny kódují důležité proteiny, které se zúčastní oprav chyb DNA, tzv. mismatch repair proteins (viz MMR systém). Pro pacienty s Lynchovým syndromem je typická mikrosatelitová instabilita, která se vyskytuje s 90% frekvencí. Pacienti s CRC spojeným s HNPCC mívají lepší prognosu s ohledem na stadium a věk než pacienti s FAP, což pravděpodobně souvisí s genetickou nestabilitou, která může

vést ke změnám už v nádorové buňce, která není kompatibilní s růstem nádoru. (KŘEPELOVÁ et al., 2006, NUSSBAUM et al., 2004, ROSYPAL, 2002)

Juvenilní polyposa

Jde o autosomálně dominantní onemocnění s neúplnou penetrancí a manifestuje polypy v tračníku, tenkém střevě a žaludku. Nástup onemocnění bývá velmi časný, a to i před dovršením 10. roku věku. Zárodečná mutace bývá v případě této nemoci na chromosomu 18q v genu *SMAD4/DPC4*.

Peutz-Jaghersův syndrom (PJS)

PJS je vzácné autosomálně dominantní onemocnění s nízkou penetrancí. Je charakteristické vývojem polypů v gastrointestinálním traktu a 95% pacientů s PJS mívá melaninové skvrny na rtech a ústní sliznici. Gen zodpovědný za vznik PJS byl objeven v lokusu 19p13.3, jeho mutace se vyskytuje v řadě rodin. Kóduje serin/threoninkinasu a byl pojmenován zkratkou *LKB1* (někdy také *STK11*), je významný pro signalisaci a diferenciaci buněk. (EELES et al., 2004)

2.3.7. Vznik kolorektálního karcinomu - Fearon-Vogelsteinův model

V roce 1990 Fearon a Vogelstein presentovali důkazy o několikastupňovém modelu formace sporadického kolorektálního karcinomu. Tento model vývoje kolorektálního karcinomu z adenomových polypů popisuje postupný vznik somatických mutací u několika protoonkogenů a tumor-supresorových genů. U protoonkogenů dochází v důsledku mutací k aktivaci, u tumor-supresorů naopak k deaktivaci (Obrázek 6). Tento model také předpokládá sekvenční akumulaci chyb, při které k některým mutacím dochází v časně a k jiným v pozdější fázi transformace.

Geny, které jsou na počátku této dráhy, jsou tumor-supresorový gen *APC* a onkogen *K-Ras*. Tumor-supresor *APC* (viz Gen *APC*) kóduje protein s funkcí buněčné adheze a bývá mutován u téměř poloviny sporadických nádorů kolorekta, přičemž mutace nastávají většinou v jiných oblastech než při FAP. Mutace *K-Ras* protoonkogenu, jehož produkt se účastní intracelulární signalisace, jsou detekovány u 40 - 60% sporadických kolorektálních karcinomů.

Typickým projevem v pozdní fázi vývoje jsou delece na chromosomu 18q v oblasti genu *DCC*. Posledním z genů mutujících dle tohoto modelu je tumor-supresor *TP53*, který kóduje transkripční faktor, který má zásadní funkci při regulaci buněčného

cyklu a při apoptose. Finální fází Fearon-Vogelsteinova modelu je nekontrolovaný růst buněk a vznik metastas.

Během dvaceti let se Fearon-Vogelsteinův model doplnil a upřesnil. Byly odhaleny další geny a mechanismy účastníci se kancerogeneze CRC, které zapadají do koncepce tohoto modelu. (MINÁRIK & MINÁRIKOVÁ, 2005)

Genomová a epigenetická instabilita je hlavním charakteristickým znakem kolorektální karcinogeneze. Pro kolorektální karcinomy byly popsány nejméně čtyři typy těchto instabilit, a to **chromosomová instabilita (CIN)**, **mikrosatelitová instabilita (MSI)**, **methylace CpG ostrovů (CpG island methylator phenotype - CIMP)** a **globální DNA hypomethylace**. (PRITCHARD & GRADY, 2010)

Obrázek 6 - klasický Fearon-Vogelsteinův model kolorektální karcinogeneze



Mutace v některém důležitém genu buňky (např. *APC*) vede k hyperplasii buněk sliznice, ke vzniku polypů. Další mutace (*K-Ras*) vedou k tvorbě postupně benigního adenomu, dále středního adenomu a dalšího, který je charakterisovaný inaktivací *DCC*. Ztráta funkce genu *TP53* vede k malignímu karcinomu.

Chromosomová instabilita

Je nejběžnější formou genomové instability, lze ji identifikovat asi v 85% všech kolorektálních karcinomů. Je definována jako přítomnost několika chromosomových

změn nebo několika strukturních aberací. Navzdory vysoké frekvenci výskytu CIN zůstávají mechanismy zapříčiňující vznik CIN v tumorové progresi stále neobjasněny. Existuje důkaz ukazující, že CIN podporuje progresi rakoviny zvyšováním diversity klonů. Z klinického hlediska je důležité, že tumory s CIN vykazují špatnou prognosu. (PRITCHARD & GRADY, 2010)

Jednou z forem chromosomové instability je ztráta heterozygosity (loss of heterozygosity - LOH), zmíněná již u tumor-supresorových genů. Pokud se v nějaké somatické buňce nachází heterozygosity pro určitý tumor-supresorový gen, může být inaktivace tohoto tumor-supresoru realizována ztrátou druhé (zdravé) alely, tedy ztrátou heterozygosity. Tato událost může mít několik příčin, mezi něž patří nondisjunkce (ztráta chromosomu se zdravou alelou), nondisjunkce spojená s duplikací chromosomu s aberantní alelou, mitotická rekombinace, delece nebo bodová mutace. (ROSYPAL, 2002)

Mikrosatelitová instabilita

Mikrosatelitově nestabilní tumory (viz MMR systém), které tvoří 15% sporadických forem kolorektálních karcinomů, vykazují nestabilitu v mono- a dinukleotidových repetitivních sekvencích DNA. Podle počtu lokusů, ve kterých je objevena mikrosatelitová instabilita, se nádory s MSI člení na mikrosatelitově stabilní (MSS), MSI-low (MSI-L) a MSI-high (MSI-H). Tumor je klasifikován jako MSS tehdy, když je MSI objevena v méně než 10% lokusů. V případě MSI-L je to 10 - 29% lokusů a od 30% se klasifikuje jako MSI-H.

Na rozdíl od CIN základní mechanismus MSI je relativně dobře znám a obnáší inaktivaci genů kódujících MMR systém, buď aberantní metylací nebo somatickou mutací. MSI-L nádory se liší svými klinicko-patologickými vlastnostmi jen velmi málo od MSS tumorů a pravděpodobně vznikají ztrátou heterozygosity (LOH) v MMR genech. Naproti tomu vysoký stupeň MSI vypovídá spíše o vzniku epigenetickým umlčováním MMR systému metylací. (PAWLIK et al., 2004, PRITCHARD & GRADY, 2010)

Hypermethylace

Epigenetická instabilita v kolorektální karcinogenesi se projevuje hypermethylací genových promotorů obsahující CpG ostrovy (CpG island methylator phenotype).

Globální DNA hypomethylace

Snížení úrovně methylace bylo nalezeno v mnohých CRC a je těsně spojeno s CIN tumory. Je ovšem nezbytný další výzkum pro určení měřitelnosti globální DNA hypomethylace, které by mělo klinické využití. (PRITCHARD & GRADY, 2010)

2.3.8. Krátký přehled genů souvisejících se vznikem CRC

Gen APC

8500 basí dlouhý gen *APC* je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu 5 (5q21 - 5q22), přičemž je jeho struktura organizována do 15 exonů. (ROSYPAL, 2002)

Funkcí proteinového produktu genu *APC* je vázat protein β -katenin, který se nachází v cytoplasmě. β -katenin se přirozeně váže i k dalším proteinům, včetně transkripčních faktorů, které umožňují přepis genů, jejichž proteinové produkty podporují buněčné dělení. Interakce s těmito faktory jsou upřednostňovány tehdy, když povrch buňky zasahují signály, jež ji poděčují k dělení. V nepřítomnosti těchto signálů tvoří protein pAPC komplex s β -kateninem, který je následně odbouráván. Touto cestou se koncentrace β -kateninu v cytoplasmě udržuje na nízké úrovni a β -katenin tak nemůže interagovat s transkripčními faktory, které vedou buňku k dělení. Buňky s mutovaným pAPC ztrácejí schopnost kontrolovat hladinu β -kateninu. Tím zůstávají neustále ve stavu dělení a mohou tvořit adenomy. (SNUSTAD et al., 2009)

Gen K-Ras

Protoonkogen *K-Ras* kóduje monomerní G-protein s GTPasovou aktivitou, který určuje osud buňky převzetím signálu z aktivovaných receptorů s následným předáváním svým efektorům, čímž způsobuje rozdílné buněčné odpovědi, jako je proliferace, diferenciace a přežití buněk.

K-Ras protoonkogen (c-Ki-Ras-2) byl lokalizován na chromosomu 12 v oblasti 12p12.1 a má šest exonů. (BÓDAY et al., 2009b)

Protein Ras je členem velké rodiny malých GTP-vázajících proteinů s jedinou podjednotkou. Ras funguje jako molekulový přepínač. Cyklicky prochází dvěma různými konformačními stavy: aktivním, když je navázán GTP, a neaktivním, když je navázán GDP. Interakce s aktivujícím proteinem způsobí výměnu GDP v molekule Ras za GTP, tedy přechod do aktivního stavu. Po chvíli je Ras znovu vypojen hydrolysou GTP na GDP. Ras je spřažen s receptorovou tyrosinkinasou krátkými úseky spojovacích proteinů, z nichž poslední je protein aktivující Ras.

V aktivním stavu zahajuje Ras aktivaci fosforylační kaskády, ve které se postupně fosforyluje řada proteinkinás a signál se tak přenáší až po regulační proteiny určitých genů, což ovlivňuje jejich přepis. Výsledkem je změna v modelu genové exprese. To může stimulovat proliferaci buněk, prodlužovat přežití buňky, nebo řídit diferenciaci buňky. (ALBERTS et al., 1998)

Mutanty obsahující onkogen *Ras* nehydrolysuje GTP. Proto je v takovém případě Ras protein v trvale aktivní GTP-vázané formě a neustále působí na cílové proteiny, čímž může navozovat onkogenní proces. (ROSYPAL, 2002)

Gen *DCC*

Nachází se na dlouhém raménku 18. chromosomu (18q21.1). Sestává z 29 exonů, jeho proteinový produkt se skládá z 1447 aminokyselin.

DCC-protein hraje důležitou roli coby adhesní molekula. Buněčné adhesní molekuly zprostředkovávají přenos signálu k diferenciaci buňky. Ztrátou DCC proteinu se zřejmě zastavuje přenos signálu k diferenciaci, což nutí buňku do deregulovaného dělení. (KUBÁČKOVÁ et al., 2000, ROSYPAL, 2002)

Gen *TP53*

Je lokalizován na chromosomu 17 v oblasti 17p1. Je dlouhý 20 000 basí a sestává z 11 exonů. Protein p53 se nachází ve všech tkáních a jeho funkce je mnohostranná. Byl obrazně nazván jako „strážce genomu“, jelikož chrání DNA před poškozením radiací a chemickými kancerogeny. Ochrany genomu dosahuje tím, že koordinovaně zastavuje dělení buňky se stimulací oprav DNA a apoptosy. Inaktivace tohoto genu vede k neoplastické transformaci a vzniku nádorů různého typu. Z rozmanitosti těchto nádorových onemocnění s mutovaným *TP53* vyplývá, že p53 neurčuje nějaký tkáňově specifický děj, ale má obecnější a širší dosah týkající se regulace buněčného dělení. (ROSYPAL, 2002)

MMR systém (mismatch repair systém)

DNA polymerasa je enzym fungující s vysokou přesností, frekvence chyb při replikaci DNA je 1 chyba na 10^7 vložených nukleotidů. Přesto jí však některé chyby uniknou a v DNA zůstávají některé nesprávně se párující nukleotidy. Opravou těchto chyb se zabývá DNA **MMR systém** (DNA mismatch repair system). Tento systém zvyšuje přesnost replikace asi 1000x. Kromě replikačních chyb opravuje i chyby DNA vzniklé kontinuálním poškozením z vnějšího prostředí (UV záření a jiné fyzikální vlivy, mutageny, metabolity, radikály apod.). (ALBERTS et al., 1998)

Mezi MMR geny patří například tyto: *hMSH2* (2p16), *hMLH1* (3p21), *hMSH6* (2p16), *hPMS2* (7q22) a *hPMS1* (2q31). Produkty těchto genů tvoří multienzymové komplexy, které se již přímo zúčastňují oprav DNA. (ROSYPAL, 2002)

Pokud jeden z těchto genů zmutuje, je oprava chyby v DNA znemožněna. Důsledkem ztráty funkce tohoto opravného systému se až o tři řády zvýší frekvence vzniku mutací v postižených dceřiných buňkách. Přímý důsledek pak závisí na umístění dané mutace. Nesprávné párování nukleotidů se objevuje v průběhu replikace DNA hlavně v jednoduchých repetitivních sekvencích, např. mikrosatelitech. Postihne-li tuto oblast genomu, nemá funkční význam, ale můžeme ji prokázat molekulárně genetickým testem jako **mikrosatelitovou instabilitu (MSI)** v nádorové tkáni. Postihne-li mutace kódující oblast nějakého genu, kde se taková citlivá repetitivní sekvence vyskytuje, může to být jeden ze stupňů ke vzniku karcinomu. (KŘEPELOVÁ et al., 2006)

3. Metodika a materiál

3.1. Soubor pacientů

V této práci jsme analysovali metodami molekulární genetiky MSI a LOH u 121 pacientů. Každý pacient před chirurgickým zákrokem podepsal informovaný souhlas umožňující molekulárně genetickou analýzu s následným zapojením do aplikovaného výzkumu a anonymní publikaci výsledků.

Biologickým materiálem byla nádorová tkáň (TU), nenádorová tkáň (NT) a nesrážlivá krev.

Vzorky podrobené analýze v této práci byly získány z Biopstické a cytologické laboratoře P&R Lab a.s., Oddělení patologie, NsP Nový Jičín, patřící do Komplexního onkologického centra, Nový Jičín.

3.2. Používané metody

Ze vzorků nádorových a nenádorových tkání jsme isolovali DNA za použití kitu QuickGene DNA Tissue Kit S (DT-S) (FUJIFILM Corp.) na membránách s pomocí přístroje FUJIFILM Quick-Gene 80.

U 11 pacientů, jejichž nenádorová tkáň nebyla k dispozici, jsme provedli izolaci DNA z plné krve vysolovací metodou za použití Kit Gentra (Quiagen, Germany).

Isolovaná DNA byla následně použita pro polymerasovou řetězovou reakci (PCR), která byla provedena v termocykleru Biometra (Schoeller, Germany).

Analýza PCR produktů byla provedena za použití DNA čipů na přístroji Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA) a pomocí denaturační polyakrylamidové elektroforesy.

Značené PCR produkty určené pro fragmentační analýzu byly fragmentovány v přístroji 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

3.3. Sledované vysoce polymorfní lokusy

V této práci jsme analysovali 8 vysoce polymorfních lokusů, za účelem odhalení MSI a LOH. Používané polymorfismy jsou doporučeny na seznamů lokusů pro citlivou a jasnou detekci a definování MSI statusu organizacemi HNPCC Cancer Study Group in Germany, American Joint Commission on Cancer a International Collaborative Group on HNPCC. (BOLAND et al. 1998)

Tabulka 1 - přehled námi používaných lokusů

Polymorfismus	Lokus	Blízko ležící gen
D5S346	5q21 - 5q22	<i>APC</i>
D5S299	5q15 - 5q23	<i>APC</i>
D17S250	17q11.2 - 17q12	<i>BRCA1</i> lokus
D2S123	2p21 - 2p22	<i>hMSH2</i>
D18S35	18q21.1 - 18q21.31	<i>DCC</i>
BAT25	4q12	intron genu <i>KIT</i>
BAT26	2p16	intron genu <i>hMSH2</i>
BAT40	1p13.1	intron genu <i>HSD3B1</i>

Polymorfismy BAT25, BAT26 a BAT40 jsou mononukleotidové repeaty (A)_n. Zbývající polymorfismy jsou dinukleotidové repetice (CA)_n.

3.4. Způsob hodnocení

Na základě porovnání genotypů získaných po molekulárně genetické analýze z nádorové a nenádorové tkáně jsme určili přítomnost MSS (nádor s mikrosatelitovou stabilitou), MSI (nádor s mikrosatelitovou instabilitou) nebo LOH (nádor vzniklý ztrátou heterozygosity).

Nádory, které vykazovaly MSI, jsme rozdělili do dvou skupin.

Nádory, ve kterých jsme našli MSI v jednom až dvou lokusech, byly označeny MSI-L (low mikrosatellite instability - nízká mikrosatelitová instabilita).

Jako MSI-H (high mikrosatellite instability - vysoká mikrosatelitová instabilita) byly označeny tumory, v jejichž DNA byla nalezena MSI ve třech a více lokusech.

3.5. Isolace DNA z tkáně

(modifikovaný protokol: Protocol QuickGene DNA tissue kit S (DT-S), FUJIFILM Corporation, Tokio, Japan)

Příprava lysátu tkáně

1. Homogenisovat asi 5 mg tkáně pomocí skalpelu a pinzety. Vzorek přenést do 2 ml mikrozkuhavky.

Přidat 180 µl roztoku MDT a následně 20 µl EDT. Inkubovat při 55 °C přes noc. (V případě nedostatečného rozpuštění tkáně lze zdvojnásobit množství MDT a EDT v mikrozkuhavce.)

2. Centrifugovat 3 min při 10 000 rpm při pokojové teplotě.

3. Odsát 200 µl lysátu do nové 1,5 ml mikrozkuřavky a přidat 180 µl LDT.
4. Vortexovat.
5. Inkubovat 10 min při 70 °C.
6. Přidat 240 µl 98% ethanolu.
7. Vortexovat. (Lysát lze v tomto stavu skladovat při 4 °C a před pokračováním je nutné jej temperovat při 37°C cca 10-20 min.)

Isolace na přístroji

1. Krátce centrifugovat. Do stojanu přístroje připravit odpadní nádobku a kasetový zásobník (cartridge). Stojan postavit do přední řady přístroje (pro promývání).
2. Celý lysát přenést do připraveného zásobníku ve stojanu přístroje.
3. Přístroj spustit a nechat běžet, dokud veškerý obsah neprojde přes filtr.
4. Do zásobníku pipetovat 750 µl roztoku WDT.
5. Přístroj spustit a nechat běžet, dokud veškerý obsah neprojde přes filtr.
6. Do zásobníku pipetovat 750 µl roztoku WDT.
7. Přístroj spustit a nechat běžet, dokud veškerý obsah neprojde přes filtr.
8. Do zásobníku pipetovat 750 µl roztoku WDT.
9. Přístroj spustit a nechat běžet, dokud veškerý obsah neprojde přes filtr.
10. Stojan přesunout do zadní strany (pro eluci DNA).
11. Do zásobníku přidat 100 µl roztoku CDT.
12. Přístroj spustit a nechat běžet, dokud veškerý obsah neprojde přes filtr.
13. Genomickou DNA skladovat při 4 °C.

3.6. Isolace genomické DNA z krve

(protokol Kit PUREGENE, Gentra, Qiagen, Düsseldorf, Germany)

DNA pacientů byla získána z 300 µl nesrážlivé krve s EDTA vysolovací metodou.

Postup:

1. Přenést 300 µl krve do 1,5 ml mikrozkuřavky.
2. Přidat 900 µl RBC Lysis Solution, zamíchat a inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
3. Centrifugovat při 13 000 - 16 000 rpm/20 sekund.
4. Odsát supernatant tak, aby nad peletem zůstalo 10 - 20 µl tekutiny.
5. Přidat 300 µl Cell Lysis Solution, zamíchat a inkubovat 1 - 5 minut při pokojové teplotě.
6. K precipitaci proteinů přidat 100 µl Protein Precipitation Solution.
7. Vortexovat 20 sekund.
8. Centrifugovat při 13 000 - 16 000 rpm/3 minuty.

9. Přenést supernatant do mikrozkušky obsahující 300 µl 100% isopropanolu.
10. Obracet mikrozkušku (50x) a sledovat srážení DNA.
11. Centrifugovat při 13 000 - 16 000 rpm/1 minutu.
12. Opatrně odsát supernatant.
13. Přidat 300 µl 70% ethanolu.
14. Centrifugovat při 13 000 - 16 000 rpm/1 minutu.
15. Opatrně odsát supernatant.
16. DNA vysušit při 60°C několik minut.
17. Rozpustit DNA v 20 - 100 µl DNA Hydratation Solution (při rozpuštění ve 100 µl je koncentrace 100 µg/ml, celkové množství DNA je 5-15 µg).

3.7. Polymerasová řetězová reakce vybraných vysoce polymorfních lokusů

3.7.1. Polymerasová řetězová reakce s neznačenými primery

Sekvence používaných primerů:

D5S346

Forward: 5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG-3'

Reverse: 5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'

D17S250

Forward: 5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3'

Reverse: 5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3'

D2S123

Forward: 5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3'

Reverse: 5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'

D5S299

Forward: 5'-GCTATTCTCTCAGGATCTTG-3'

Reverse: 5'-GTAAGCCAGGACAAGATGACAG-3'

D18S35

Forward: 5'-AGCTAGATTTTTACTTCTCTG-3'

5'-CTGGTTGTACATGCCTGAC-3'

Zdroje sekvencí primerů:

<http://ajcp.ascpjournals.org/content/115/6/900.full.pdf>

http://www.qub.ac.uk/neph-res/Methods/DN%20Screen%20methods/6000_Markers.xls

PCR byla prováděna ve finálním objemu 20 μ l do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml. Vedle master mixu byl připravován navíc jeden blank a jeden vzorek kvůli ztrátě při pipetování.

Tabulka 2 - složení Master Mixu pro PCR

Master Mix pro 1 reakci	
injekční H ₂ O	12,2 μ l
pufr (10x)	2 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μ l
dNTPs (2 mM) (Bioline, England)	2 μ l
primer F (10 pmol/ μ l)	1 μ l
primer R (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Taq DNA pol (BioTaq, Bioline, England)	0,2 μ l
DNA	(1 μ l)
celkem (bez DNA)	20 μl (19 μl bez DNA)

3.7.2. Polymerasová řetězová reakce se značeným F primerem pro fragmentační analysu

Sekvence používaných primerů:

BAT40:

Forward: 5'-TET-ATTA ACTTCCTACACCACAAC-3'

Reverse: 5'-GTAGAGCAAGACCACCTTG-3'

BAT26

Forward: 5'-TET-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'

Reverse: 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3'

BAT25

Forward: 5'-HEX-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3'

Reverse: 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'

PCR byla prováděna ve finálním objemu 20 μ l do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml. Vedle master mixu byl připravován navíc jeden blank a jeden vzorek kvůli ztrátě při pipetování. F-primery byly fluorescenčně značeny.

Tabulka 3 - složení Master Mixu pro PCR

Master Mix pro 1 reakci	
injekční H ₂ O	12,7 µl
pufř (10x)	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 µl
dNTPs (2 mM) (Bioline, England)	2 µl
primer F (10 pmol/µl)	1 µl
primer R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA pol (BioTaq, Bioline, England)	0,2 µl
DNA	(0,5 µl)
celkem (bez DNA)	20 µl (19,5 µl bez DNA)

3.8. Separace a analýza PCR produktů

3.8.1. Separace neznačených PCR produktů na DNA čípech - Agilent DNA 1000 Assay protokol

(protokol přístroje Bioanalyzer 2100, Agilent, California, USA)

(analysované lokusy: D2S123, D5S299, DS346, D17S250, D18S35)

Příprava gel-dye mixu

Používané roztoky chránit před světlem.

1. Před manipulací temperovat DNA Dye concentrate a DNA gel matrix při pokojové teplotě po dobu 30 min.
2. Vortexovat DNA Dye concentrate a přidat 25 µl této látky do DNA gel matrix.
3. Vortexovat roztok a odstředit krátce ke dnu a přenést do filtrační jednotky přiložené mikrozkuřavky.
4. Centrifugovat při 2240 g ± 20% na 15 min. Skladovat při 4 °C.

Nanášení gel-dye mixu na čip

1. Gel-dye mix po vyjmutí z lednice před použitím temperovat po dobu 30 min.
2. Vložit nový DNA čip do přípravné stanice.
3. Pipetovat 9 µl gel-dye mixu do otvoru označeného **G**.
4. Nastavit píst přípravné stanice na objem 1 ml a stojan uzavřít.
5. Píst stlačit až po zarážku.
6. Čekat 60 s, poté uvolnit zarážku.
7. Čekat 5 s. Pomalu vytáhnout píst na objem 1 ml.

8. Otevřít přípravnou stanici a pipetovat 9 μ l gel-dye mixu do 2 otvorů označených **G**.

Nanášení markeru na čip

1. Pipetovat 5 μ l DNA markeru (ohraničující separační prostor) do všech 12 otvorů pro vzorky a do otvoru pro žebřík.

Nanášení žebříku a vzorků na čip

1. Pipetovat 1 μ l DNA žebříku (ladder - velikostní marker) do otvoru označeného **H**.
2. Do příslušných otvorů čipu očíslovaných 1 až 12 nanést PCR produkty o objemu 1 μ l (nebo 1 μ l deionisované vody).
3. Čip vortexovat 1 min při 2400 rpm (IKA MS 3 Vortexer, USA).
4. Čip vložit do přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer a spustit přístroj, za použití programu DNA 1000 series II.

3.8.2. Separace neznačených PCR produktů v denaturační polyakrylamidové gelové elektroforese (PAGE)

K dělení fragmentů po PCR byla použita vertikální elektroforesa za použití 8% denaturačního polyakrylamidového gelu (7M, AA:NNBISA = 19:1). Analysované lokusy: D2S123, D5S299, D5S346, D17S250 a D18S35.

Postup:

1. Připravit 1 litr zásobního roztoku denaturačního akrylamidu.

Složení:

- 380 g akrylamid
- 20 g NN-bisakrylamid
- doplnit destilovanou vodou na 1 litr

2. Umýt a vyleštit skla.
3. Sestavit aparaturu pro vertikální elektroforesu.
4. Připravit 8% pracovní roztok akrylamidu.

Složení:

- 420 g močoviny
- 200 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu
- 300 ml destilované vody
- 100 ml TBE pufru (10x)
- po rozpuštění doplnit destilovanou vodou na 1 litr

Na dva gely se použije 100 ml 8% pracovního roztoku akrylamidu a přidá se:

- 200 μ l TEMED (tetramethylenethyldiamin)

- 200 μ l APS (persulfát amonný)

Zbytek 8% pracovního roztoku akrylamidu se skladuje do dalšího použití v lednici při teplotě 4 - 8°C.

5. Roztok promíchat a pipetou pomalu vlévat mezi skla aparatury. Poté vložit hřeben pro vytvoření štěrbin. Nechat gel polymerovat.
6. Aparaturu vložit do nádoby pro elektroforesu, zalít 1x TBE pufrem.
7. Po asi 20 minutách vytáhnout hřebeny a pročistit jamky injekční stříkačkou s 1x TBE pufrem.
8. Nanést vzorky za použití nanášecího pufru (bromfenolová modř a xylencyanol v 80% formamidu) v určeném pořadí.
9. Přiklopit víko a připojit ke zdroji stejnosměrného napětí.
10. Spustit zdroj stejnosměrného napětí a nechat běžet asi 1,5 h při 800 - 1200 V, tak aby teplota gelu byla 50°C. Kontrolu teploty gelu provádět pomocí teplotního čidla.
11. Po skončení elektroforesy vypnout zdroj stejnosměrného napětí, rozebrat aparaturu a vyjmout gel.
12. Gel dvakrát opláchnout destilovanou vodou v misce.
13. Přenést gel do 300 ml čerstvě připraveného fixačního roztoku (15% methanol:0,5% kyselina octová v poměru 1:1).
14. Fixovat 10 minut na třepačce.
15. Opláchnout destilovanou vodou (2 x 30 s).
16. Přidat 300 ml 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného a nechat působit asi 30 minut na třepačce.
17. Opláchnout dvakrát krátce v destilované vodě.
18. Krátce opláchnout v 300 ml 1,5% roztoku hydroxidu sodného.
19. Vyvíjet ve vývojce (300 ml 0,08% tetraboritanu disodného, 300 ml 1,6% methanalu a 300 ml 1,5% hydroxidu sodného).
20. Pozorovat vyvíjení, po dokončení vylít vývojku a fixovat gel po dobu 30 min v 5% kyselině octové.

3.8.3. Analýza značených PCR produktů

1 μ l PCR produktu se smíchalo s 15 μ l 80% formamidu a fragmentoval se na sekvenátoru ABI-3100 Avant (Applied Biosystems, USA). Výsledky se analysovaly za použití software GeneMarker. Analysované lokusy: BAT 25, BAT 26 a BAT 40.

3.9. Výsledky

V souboru našich 121 pacientů jsme našli mikrosatelitovou instabilitu u 39 pacientů (32,23% z celku) alespoň v jednom ze sledovaných lokusů. U 15,70% našich CRC pacientů jsme určili MSI-L. 16,53% tumorů bylo diagnostikováno jako MSI-H (viz Tabulka 5).

Nejčastěji se vyskytovala MSI v lokusu BAT 26. Bylo to u 25 pacientů (20,66%). MSI v lokusu D5S299 se vyskytla pouze šestkrát (4,96%) a je tak lokusem s nejnižším výskytem MSI (viz Tabulka 4). Celkový výskyt MSI je zahrnut v Grafu 2.

17 pacientů (14,05%) mělo MSI ve všech třech lokusech BAT (viz Tabulka 5).

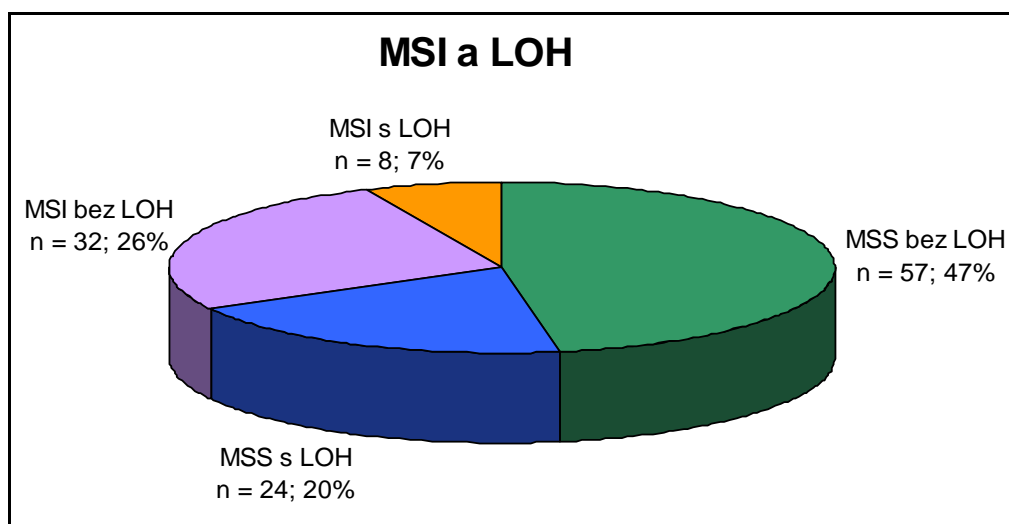
U 82 pacientů (67,77%) nebyla prokázána ani jedna mikrosatelitová instabilita a byli označeni jako MSS (Tabulka 6).

32 pacientů (26,45%) ukázalo LOH alespoň v jednom lokusu (Tabulka 7). 89 pacientů (73,55%) nemělo tedy ani jednu delecí.

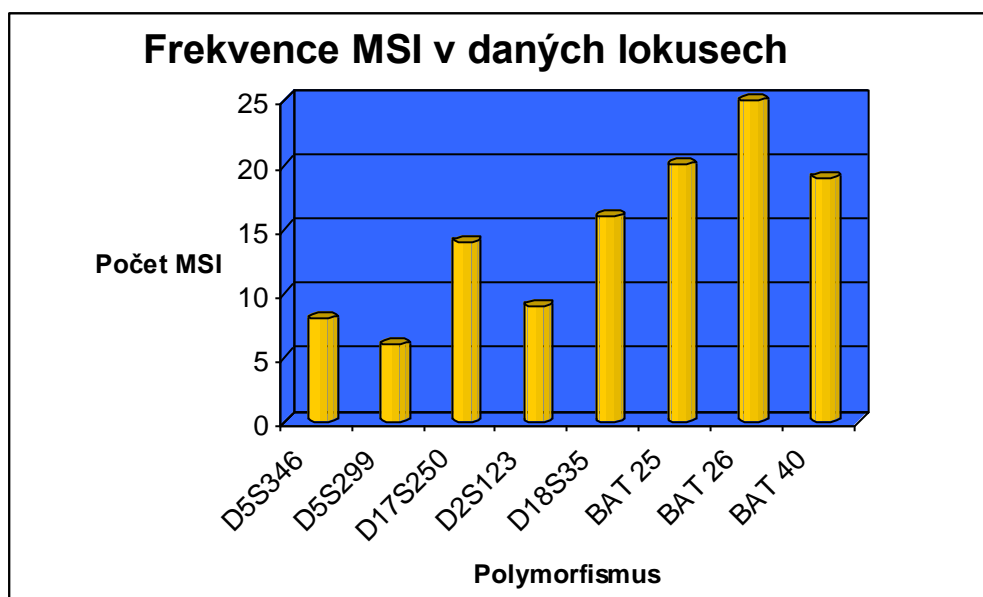
U 7 pacientů (5,79%) se dá předpokládat rozsáhlá delecí na 5. chromosomu, protože u nich byla objevena LOH v obou lokusech pátého chromosomu (Tabulka 7). Z toho u šesti z nich nebyla nalezena ani jedna MSI.

Nejčastěji byl deletován lokus D5S346. Stalo se tak v 18 případech (14,88%). Nejméně častým deletovaným lokusem byl D2S123. Byl deletován pouze u jednoho pacienta (Tabulka 4). Přehled delecí v jedlotlivých lokusech je zpracován v Grafu 3.

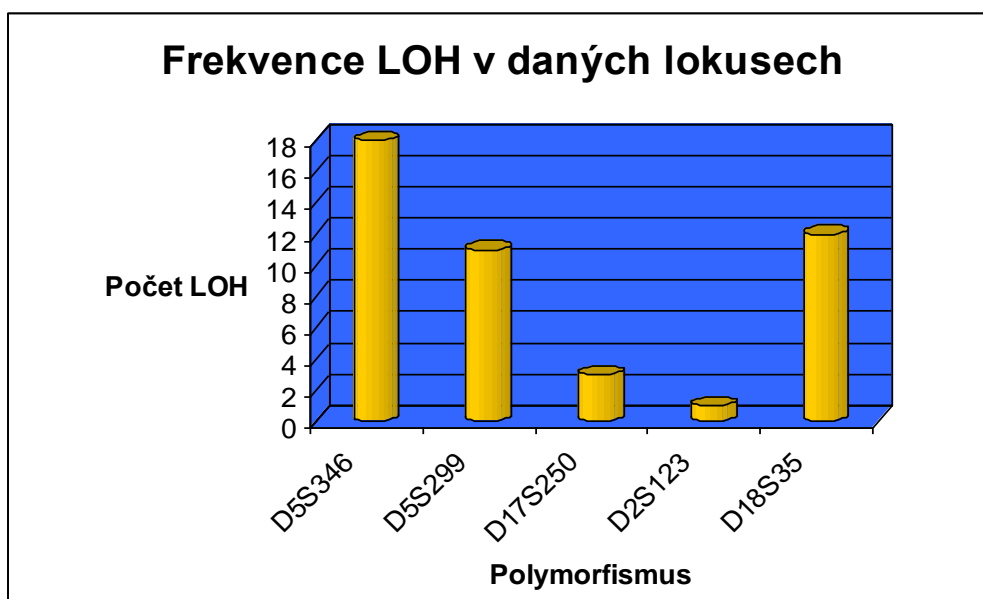
Graf 1 - srovnání frekvence MSI a LOH



Graf 2 - frekvence MSI



Graf 3 - frekvence LOH



Tabulka 4 - frekvence LOH a MSI tumor-supresorových genů v CRC

Lokus	MSI (n)	MSI (%)	LOH (n)	LOH (%)
D5S346	8	6,61	18	14,88
D5S299	6	4,46	11	9,09
D17S250	14	11,57	3	2,48
D2S123	9	7,44	1	0,83
D18S35	16	13,22	12	9,92
BAT 25	20	16,53	0	0
BAT 26	25	20,66	0	0
BAT 40	19	15,7	0	0

Tabulka 5 - MSI tumory

	n	%
MSI	39	32,23
<i>v 1 lokusu</i>	14	35,90 ^a
<i>ve 2 lokusech</i>	5	12,82 ^a
<i>ve 3 lokusech</i>	5	12,82 ^a
<i>ve 4 lokusech</i>	7	17,95 ^a
<i>v 5 lokusech</i>	3	7,69 ^a
<i>v 6 lokusech</i>	2	5,13 ^a
<i>v 7 lokusech</i>	1	2,56 ^a
<i>v 8 lokusech</i>	2	5,13 ^a
MSI-L	19	15,70 (48,72 ^a)
<i>bez LOH</i>	14	73,68 ^b
<i>s LOH</i>	5	26,32 ^b
MSI-H	20	16,53 (51,28 ^a)
<i>bez LOH</i>	17	85,00 ^c
<i>s LOH</i>	3	15,00 ^c
D5S346	8	6,61
D5S299	6	4,96
D17S250	14	11,57
D2S123	9	7,44
D18S35	16	13,22
BAT 25	20	16,53
BAT 26	25	20,66
BAT 40	19	15,70
mutovaný 1 BAT	5	4,13
mutavné 2 BATy	4	3,31
mutované 3 BATy	17	14,05

^a procentuální podíl z celkového počtu MSI

^b procentuální podíl z celkového počtu MSI-L

^c procentuální podíl z celkového počtu MSI-H

Ostatní hodnoty ve sloupci procent jsou podíly z celkového počtu pacientů.

Tabulka 6 - MSS tumory

		n	%
MSS	<i>počet pacientů</i>	82	67,77
	<i>bez LOH</i>	58	70,73 ^a
	<i>s LOH</i>	24	29,27 ^a

^a procentuální podíl z celkového počtu MSS

Tabulka 7 - tumory s LOH

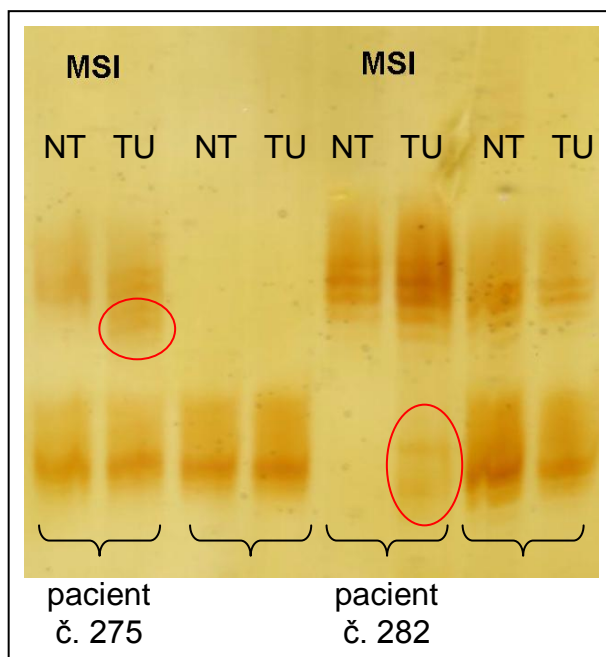
		n	%
LOH	<i>počet pacientů</i>	32	26,45
	D5S346	18	14,88
	D5S299	11	9,09
	D17S250	3	2,48
	D2S123	1	0,83
	D18S35	12	9,92
	v 1 lokusu	21	65,63 ^a
	ve 2 lokusech	9	28,13 ^a
	<i>z toho na 5. chromosomu</i>	7	21,88 ^a
	ve 3 lokusech	2	6,25 ^a

^a procentuální podíl z celkového počtu LOH

Tabulka 8 - nález homozygosity v daných lokusech

Homozygosita		
Lokus	n	%
D2S123	19	15,7
D5S299	29	23,9
D5S346	17	14
D17S250	24	19,8
D18S35	32	26,5

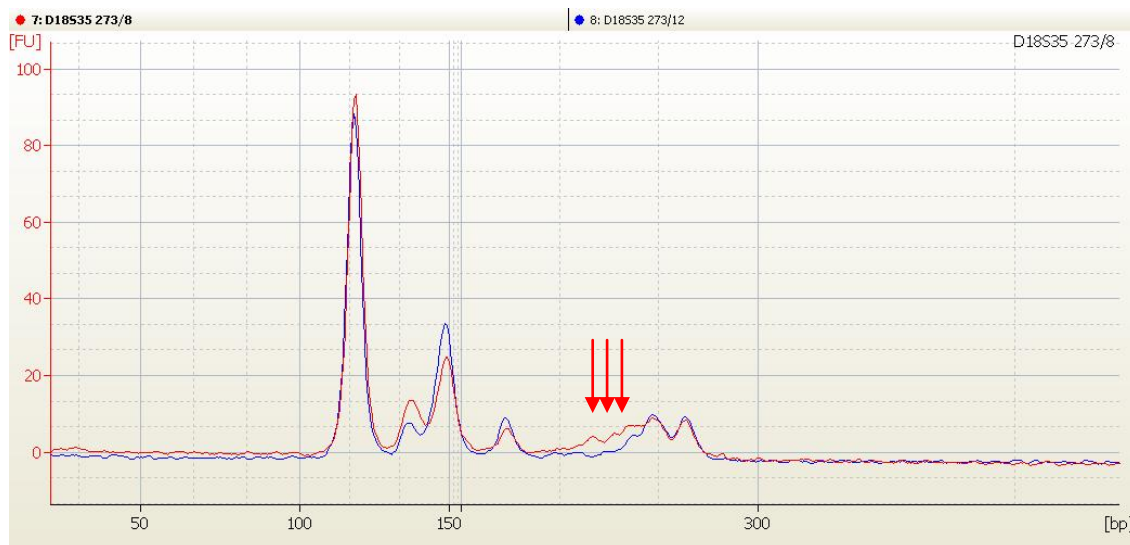
Obrázek 7 - mikrosatelitová instabilita v lokusu D18S35



Na denuračním polyakrylamidovém gelu po barvení stříbrem byla u pacientů č. 275 a 282 nalezena MSI. V obou případech je vidět přibývání alel (červeně označené) oproti nenádorovému genotypu. V ostatních případech v tomto lokusu nádory pacientů vykazují mikrosatelitovou stabilitu (MSS).

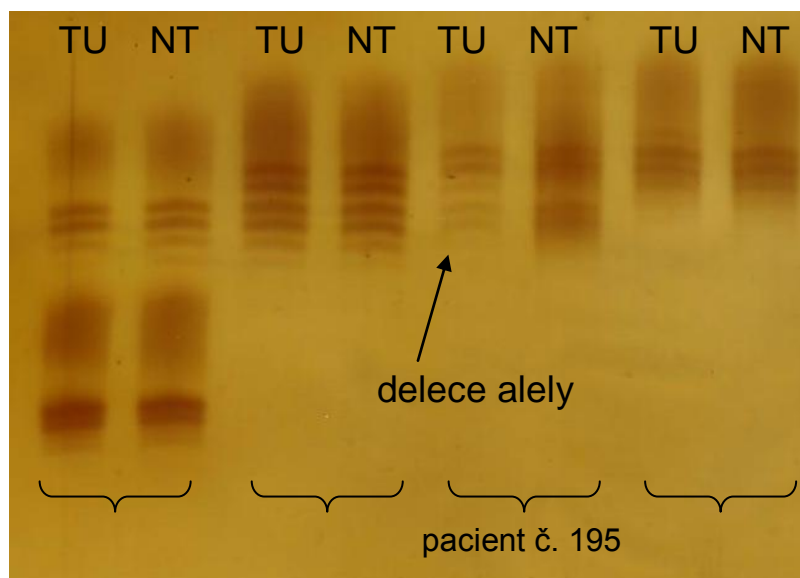
Legenda: TU - nádorová tkáň, NT - normální tkáň

Obrázek 8 - mikrosatelitová instabilita v lokusu D18S35



Na elektroferogramu modrá křivka reprezentuje normální tkáň a červená nádorovou tkáň. Šipky ukazují MSI.

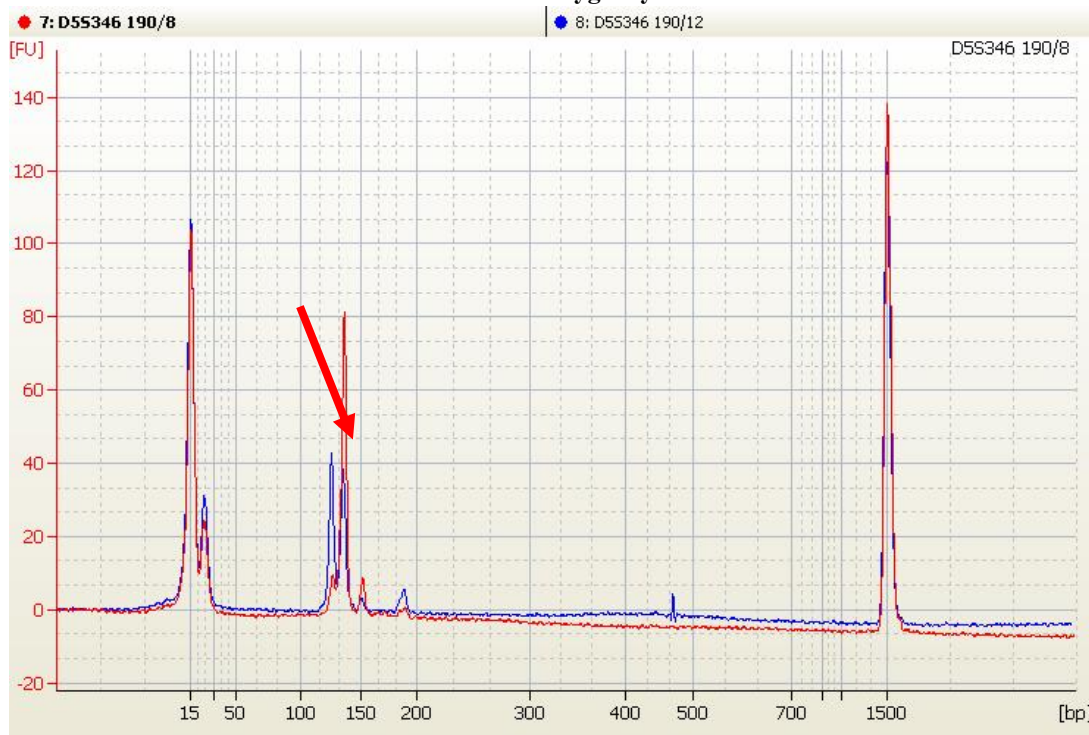
Obrázek 9 - ztráta heterozygosity v lokusu D5S299



Na denaturačním polyakrylamidovém gelu po barvení stříbrem jsme u pacienta č. 195 našli delecii. Tumor obsahuje buňky, které nesou delecii, ale i buňky, které ji nemají.

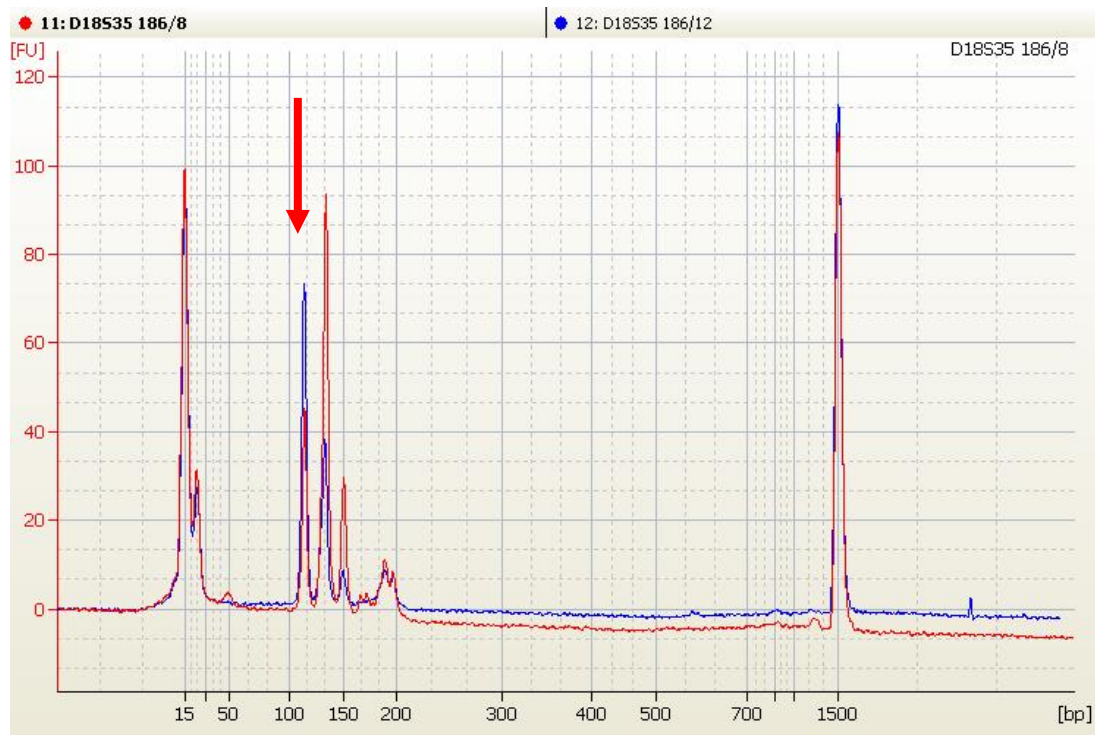
Legenda: TU - nádorová tkáň, NT - normální tkáň

Obrázek 10 - ztráta heterozygosity v lokusu D5S346



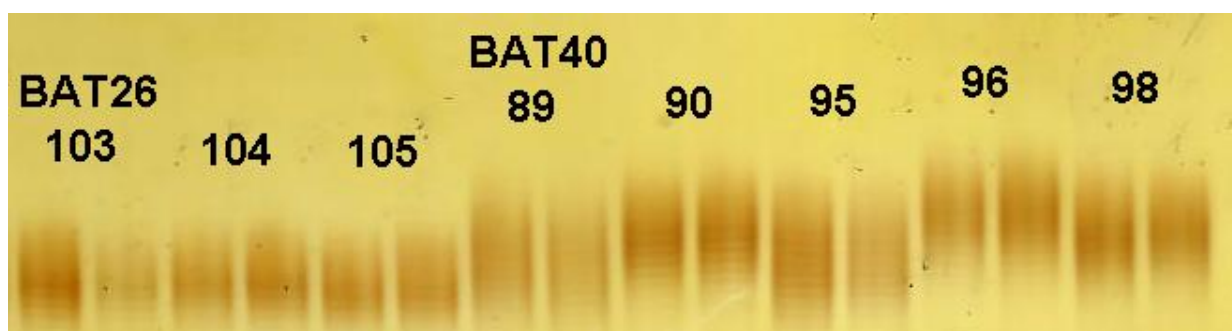
Na elektroferogramu modrá křivka reprezentuje normální tkáň a červená nádorovou tkáň. Normální tkáň je heterozygotní (má dvě alely - modře). Šipka ukazuje alelu (červeně), která je deletována. Na základě této analýzy lze soudit, že nádor obsahuje buňky, ve kterých se převážně vyskytuje delecce.

Obrázek 11 - ztráta heterozygosity v lokusu D18S35



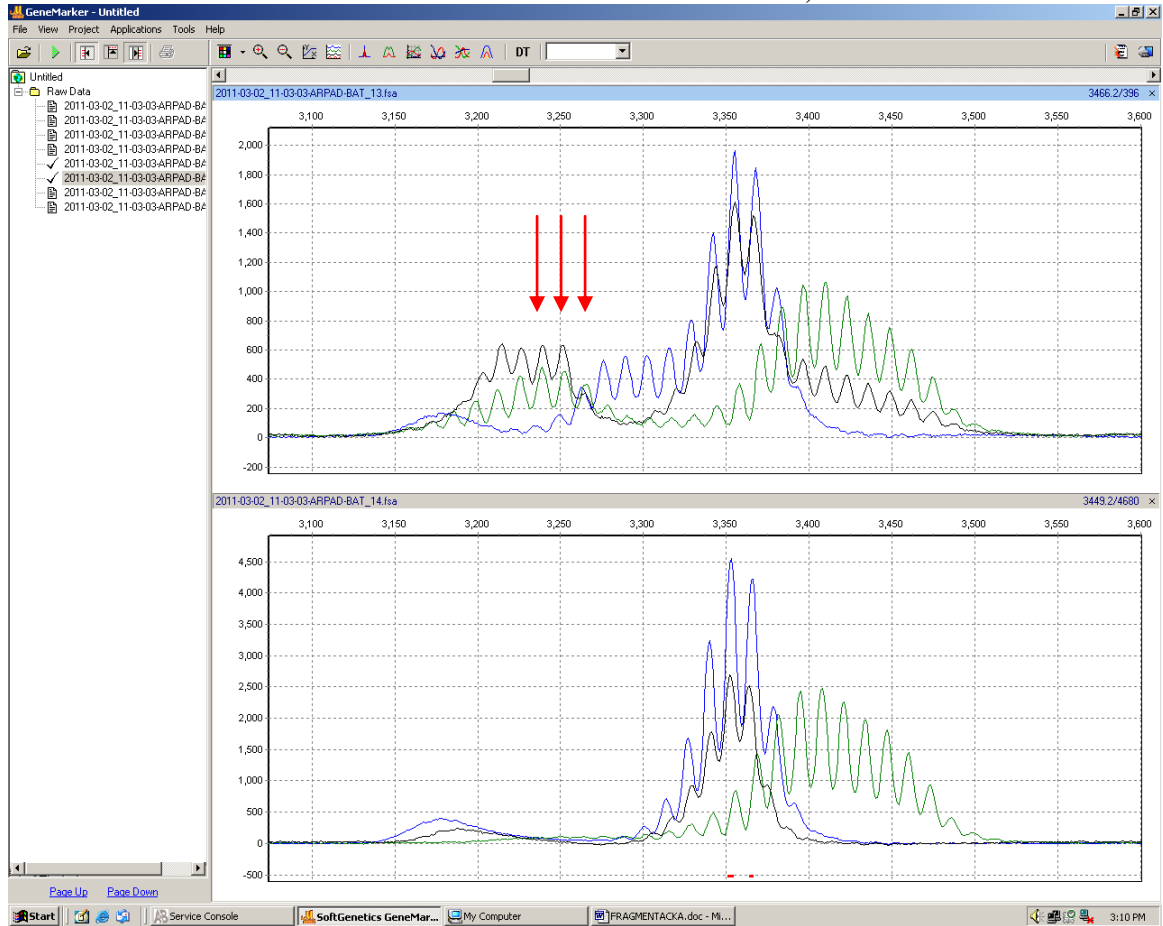
Na elektroferogramu modrá křivka reprezentuje normální tkáň a červená nádorovou tkáň. Normální tkáň je heterozygotní (má dvě alely - modře). Šipka ukazuje alelu (červeně), která je deletována. Na základě tohoto vyšetření usuzujeme, že nádor obsahuje jak buňky s delecí, tak i buňky bez delecí.

Obrázek 12 - BAT 26 a BAT 40



K porovnávání metod ukazujeme výsledky denaturační PAGE. Všechny nádory jsou mikrosatelitově stabilní.

Obrázek 13 - mikrosatelitová instabilita v lokusech BAT 25, BAT 26 a BAT 40



Výsledky fragmentační analýzy jasně ukazují přítomnost nadbytečných fragmentů (alel) v nádorové tkáni (nahore) oproti nenádorové tkáni, což je důkazem přítomnosti MSI.

Legenda: modrá křivka značí BAT25, černá křivka značí BAT26, zelená křivka značí BAT40, šipky ukazují nadbytečné fragmenty (alely).

4. Diskuse

V této práci jsme analysovali DNA od 121 pacientů. U každého z nich jsme porovnávali genotyp nádorové a nenádorové tkáně. Sledovali jsme 8 vysoce polymorfních lokusů a stanovili frekvenci výskytu MSI a LOH v souboru námi vyšetřovaných CRC pacientů.

MSI vzniká jako následek ztráty a/nebo poruchy MMR systému, jehož proteiny jsou kódovány geny *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS2* a *hPMS1*.

Ztráta heterozygosity chromosomálních oblastí, kde jsou lokalizovány geny *APC*, *BRCA1*, *DCC*, *KIT* a *HSD3B1*, přispívá k tumorigenesi.

MSI je tedy následkem (markerem) určitých změn v MMR systému oproti LOH, jež je příčinou dalších změn zasahujících do buněčného cyklu.

V našem souboru jsme našli obecně nižší frekvenci LOH, ale naopak vyšší výskyt MSI, než jiné studie. Mohlo to být způsobeno tím, že počty pacientů se ve studiích poměrně lišily. Při vyšším počtu pacientů by se naše výsledky mohly více shodovat s údaji z cizích prací. Z rozmanitých výsledků napříč množstvím vědeckých studií jasně vyplývá, že vznik sporadického kolorektálního karcinomu, jenž se zdá být procesem velmi složitým, stále čeká na své úplné objasnění.

Mikrosatelitovou instabilitu v aspoň jednom lokusu jsme v našem vzorku pacientů detekovali ve 32,23% případů. To je více, než tvrdí jiné studie. Několik ostatních studií mluví o průměrném výskytu MSI v asi 15% sporadických CRC (PAWLIK et al., 2004, PRITCHARD & GRADY, 2010). Jiná studie našla výskyt MSI ve více než 23% případů (LIN et al., 2003), další v asi 17,5% (MATSUZAKI et al., 2005) a jiné dvě ve 35% (GOEL et al., 2003, ODENTHAL et al., 2009), což je naopak vyšší frekvence než v naší práci.

Jako MSI-L bylo označeno 15,7% tumorů z našeho souboru. Jiné dvě studie našly MSI-L jen v 5% případů (DIETMAIER et al., 1999, ODENTHAL et al., 2009) a další až ve 21% (GOEL et al., 2003). MSI-H tumorů byl v našem souboru 16,53%. Jiné studie ukazují odlišné výsledky: 6,25% (LIN et al., 2003), 11% (DIETMAIER et al., 1999), 14% (GOEL et al., 2003), další až 32,5% (ODENTHAL et al., 2009).

Ztráta heterozygosity (LOH) v aspoň jednom lokusu byla v našem vzorku nalezena u 26,45% pacientů. Jiná práce našla LOH v jednom lokusu až v 81% případů (LIN et al., 2003), další ve 47% případů (DIETMAIER et al., 1999), další ve 72,5% (MATSUZAKI et al., 2005) a další v 51% (GOEL et al., 2003).

Status MSS bez LOH byl v našem vzorku stanoven u 47% pacientů. Tato frekvence se poněkud liší u jiné studie, která zjistila hodnotu 13,7% (MATSUZAKI et

al., 2005), ovšem je bližší hodnotě 37,8% (GOEL et al., 2003) a 62,5% (ODENTHAL et al., 2009). Tento status byl v našem vzorku nejpočetnější, to výrazně svědčí o existenci velmi rozmanitých souvislostí mezi dalšími geny, než které jsou doposud považovány za nejvýznamnější v tumorigenesi sporadického CRC.

MSS s LOH bylo v našem souboru 20% pacientů. Jiná studie ukázala frekvenci 68,8% (MATSUZAKI et al., 2005), další poněkud nižší frekvenci 33% (GOEL et al., 2003).

Jako MSI bez LOH jsme označili 26% tumorů. Cizí studie našla frekvenci 13,7% (MATSUZAKI et al., 2005).

Tumory s MSI i s LOH jsme našli jen v 7% případů. Další studie ukázaly frekvenci 3,8% (MATSUZAKI et al., 2005) a 17,7% (GOEL et al., 2003). Jiná práce nenašla kupodivu žádný případ MSI a LOH zároveň (DIETMAIER et al., 1999). Vzácné případy MSI s LOH, v naší práci pozorované s celkově nejmenší frekvencí, mohou souviset s úzkou souvislostí mezi MSI bez LOH a statusem MSS s LOH. Toto může být důkazem, že tumorigenese sporadického CRC neprobíhá vždy striktně jen oddělenými cestami MSI a CIN.

MSI se v našem vzorku nejčastěji vyskytovala v lokusu BAT 26, objevila se ve 20,66% případů. Jiná studie ukázala frekvenci výskytu 5,4% (LIN et al., 2003).

Lokus s nejčastějším výskytem LOH v našem vzorku pacientů byl D5S346 v blízkosti genu *APC*. Frekvence LOH byla 14,88%. Cizí studie našla frekvenci LOH v tomto lokusu v 50% případů (LIN et al., 2003). Jiná studie ukazuje hodnotu 21,3% (MATSUZAKI et al., 2005).

Alespoň jeden z námi sledovaných lokusů na pátém chromosomu je deletován u 17,36% našich pacientů. Oba lokusy leží v blízkosti genu *APC*. Mutace tohoto genu se vyskytují až v 70% případů CRC (PRITCHARD & GRADY, 2010). Jiná studie uvedla frekvenci LOH v *APC* 50% (LIN et al., 2003) a další pak 32% (DIETMAIER et al., 1999). Další zahraniční studie udává četnost alterace genu *APC* až v 80% sporadických CRC tumorů (KUBÁČKOVÁ et al., 2000).

U 5,79% pacientů se dá předpokládat rozsáhlé poškození genu *APC*, protože mají LOH na obou lokusech pátého chromosomu ležících v blízkosti tohoto genu.

Deleci lokusu D17S250 jsme dokázali ve 2,48% případů. Jiná studie našla frekvenci LOH tohoto lokusu 8% (DIETMAIER et al., 2009).

25% pacientů s LOH tumorů bylo MSS. U 75% LOH tumorů jsme našli MSI. LOH se tedy obecně vyskytovala častěji v MSI tumorech (asi 3krát častěji).

Další otázkou je, kolik delečních případů nedetekujeme z důvodu neinformativity. Neinformativita znamená, že v lokusu je pacient homozygotní pro

danou alelu. Delece jsme analysovali na základě interpretace výsledků elektroforezy. Tyto mohly být zkresleny jistými nepřesnostmi, které tato metoda nese. Dle tohoto postupu není možno kvantitativně rozlišit homozygotní genotypy a zjistit tak, zda u nich nedošlo k deleci. Při hodnocení jsme nemohli kvantifikovat deleci u 14% případů v lokusu D5S346, 23,9% v lokusu D5S299, 19,8% v lokusu D17S250, 15,7% v lokusu D2S123 a 26,5% v lokusu D18S35.

Nádor jako takový je heterogenní tkáň obsahující různé mutace a navíc i po mikropitvě může obsahovat jak buňky nádorové, tak zdravé. V závislosti na tom, jaký je mezi nimi podíl, lze více či méně určit deleci v nádorových buňkách. Převaha buněk s nedeletovanými lokusy snadno překryje na elektroferogramu deletované nádorové buňky kvůli mohutnosti polymerasové řetězové reakce.

V našem rozdělení pacientů do skupin podle výsledků (viz Graf 1) jsme jako nejfrekventovanější našli stav MSS bez LOH. Jiné studie prokázaly tuto hodnoty nižší, naopak častější případy jen s MSI nebo jen s LOH. Naše údaje dávají jednoznačný důkaz toho, že základním modelem vzniku sporadického CRC nejsou jen cesty MSI nebo CIN, ale musí existovat i více cest vzniku tohoto onemocnění. Jednou z alternativních epigenetických cest může být hypermethylace cílových genů. Dala by se tak vysvětlit příčina vzniku sporadického CRC u pacientů geneticky naprosto stabilních. Jejich cílové geny by mohly být epigeneticky „umlčeny“ hypermethylací, která by se funkčně projevila jako např. bodová mutace. Stanovení hypermethylace se provádí specifickými metodami a nebylo předmětem této práce.

5. Závěr

V této práci předkládáme výsledky MSI a LOH analýsy v souboru 121 pacientů. Práce vznikla na půdě Laboratoře molekulární biologie, P&R LAB a.s., a je součástí výzkumného projektu o karcinomu tlustého střeva a konečníku.

Kolorektální karcinom je nejčastěji se vyskytující zhoubné onemocnění ve střední i západní Evropě a vůbec ve vyspělých zemích. Kvůli vysoké frekvenci výskytu a náročnosti léčby se jedná o závažný zdravotnický i socioekonomický problém.

Nové poznatky ve vědě umožňují lepší pochopení tohoto onemocnění, zavedení nových diagnostických metod do rutinní praxe, použití nových léků a léčebných postupů, což na druhé straně enormně zvyšuje náklady na pacienta. Použití molekulárně genetických metod v rutinní praxi může být nápomocné v časně diagnostice, může zefektivnit léčbu a zajistit tak nemocným plnohodnotný a pohodlný život.

Doufáme, že naší prací a entusiasmem jsme trošku pomohli a přispěli k získání přehledu v analysovaném souboru nemocných a naše výsledky budou někdy využívány ve prospěch pacientů.

6. Použitá literatura

- 1) ADAM, Zdeněk, et al. Speciální onkologie : Příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob. Vyd. 1. Praha : Galén, 2010. Kolorektální karcinom, s. 71-80. ISBN 978-80-7262-648-9
- 2) ALBERTS, Bruce, et al. Základy buněčné biologie : Úvod do molekulární biologie buňky. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998. ISBN 80-902906-2-0
- 3) ALTANER, Čestmír. Buněčná a molekulární biologie rakoviny. 1. vydání. Praha: Radix, 2008. ISBN 978-80-86031-85-9
- 4) BÓDAY, A. Cirkulující molekulární markery v onkologii - epidemiologické aspekty, Seminář „Epidemiologie nejčastějších zhoubných novotvarů“, Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF UK a VFN v Praze, 31.1. 2011, Praha
- 5) BÓDAY, A., et al. Molekulárně genetická diagnostika kolorektálního karcinomu. Noviny : Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín [online]. 2009a, 1, [cit. 2011-03-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/noviny/noviny-01-2009.pdf>>
- 6) BÓDAY, A., et al. Protoonkogen K-ras: důležitý diagnostický a prognostický marker u onkologických pacientů, Agel Academy, 3, 43-48, 2009b
- 7) BOLAND, C. R. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. Cancer Res., 58: 5248-5257, 1998
- 8) ČIHÁK, Radomír. Anatomie 2. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1988. Systém gastropulmonální, s. 94-97. ISBN 08-060-88
- 9) DIENSTBIER, Zdeněk; STÁHALOVÁ, Vladimíra. Onkologie pro laiky. 1. vydání. Praha: Radix, 2009. ISBN 978-80-86031-86-6
- 10) DIETMAIER, W., et al. Detection of Microsatellite Instability (MSI) and Loss of Heterozygosity (LOH) in Colorectal Tumors by Fluorescence-based Multiplex Microsatellite PCR. Biochemica [online]. 1999, 2, [cit. 2011-03-20]. Dostupný z WWW: <http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/No2_99/pg42-45.pdf>
- 11) DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUDÍK Jan, VYZULA Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2011-3-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.svod.cz>>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 - 8861.

- 12) EELES, R.A., et al. Genetic Predisposition to Cancer. Second edition. London, 2004. Familial colon cancer syndromes and their genetics, s. 315-330. ISBN: 0 340 76254 3
- 13) GANONG, William F. Přehled lékařské fyziologie. 1. vydání. Jinočany: H&H, 1997. Řízení funkcí trávicího ústrojí, s. 425-426. ISBN 80-85787-36-9
- 14) GOEL, Ajay , et al. Characterization of Sporadic Colon Cancer by Patterns of Genomic Instability. Cancer Research [online]. April 1, 2003, 63, [cit. 2011-03-20]. Dostupný z WWW: <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/7/1608.full#fn-3>>. ISSN 1538-7445
- 15) HOLCÁTOVÁ, Ivana. Epidemiologie nejčastějších zhoubných novotvarů v Česku. Seminář ústavu hygieny a epidemiologie 1. LF a VFN v Praze: „Epidemiologie nejčastějších zhoubných novotvarů“, 31.1.2011
- 16) JUNQUEIRA, L. Carlos; CARNEIRO, José; KELLEY, Robert O. Základy histologie. 1. vydání. Jinočany: H&H, 1997. Trávicí ústrojí, s. 296. ISBN 80-85787-37-7
- 17) KŘEPELOVÁ, A.; PAVLÍKOVÁ, K.; PLEVOVÁ, P. Diagnostika Lynchova syndromu - nové geny a metody. Klinická onkologie. 2006, 19, s. 76-80. Dostupný také z WWW: <https://www.linkos.cz/odbornici/vzdelavani/supp_06/08.pdf >
- 18) KUBÁČKOVÁ, K.; PRAUSOVÁ, J.; HOCH, J. Několik poznámek k molekulární genetice kolorektálního karcinomu. Klinická onkologie. 2000, 5, 13, s. 151-154. Dostupný také z WWW: <http://www.linkos.cz/odbornici/vzdelavani/5_00/02.pdf>
- 19) KYSELOVÁ, K., BÓDAY, A. Genetické aspekty kolorektálního karcinomu. Agel Academy, 3, 32-38, 2009
- 20) LIN, Jen-Kou, et al. Loss of Heterozygosity and DNA Aneuploidy in Colorectal Adenocarcinoma. Annals of Surgical Oncology [online]. 2003, 10, 9, [cit. 2011-03-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/98x8m156g035er51/fulltext.pdf>>
- 21) MATSUZAKI, Koji, et al. The Relationship between Global Methylation Level, Loss of Heterozygosity, and Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer. Clin Cancer Res [online]. 15.12.2005, 11 (24), [cit. 2011-03-20]. Dostupný z WWW: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/24/8564.abstract?ijkey=d5dd63a0e1d401245460bd7c6a64b1d35274ab70&keytype2=tf_ipsecsha>. ISSN 1557-3265
- 22) MINÁRIK, M.; MINÁRIKOVÁ, P. Genetika a biologie kolorektálního karcinomu. Bulletin HPB [online]. 2005, roč. 13, č. 2, [cit. 2011-03-08]. Dostupný z WWW: <http://www.medvik.cz/kramerius/document/ABA008_187_bmc05013020-2005-

- 13.2_s.45-47.pdf;jsessionid=0DAF31A905E3EAE252D4A034532C16AF?id=172956>
- 23) NUSSBAUM, Robert L.; MCINNES, Roderick R.; WILLARD, Huntington F. Klinická genetika. 1. vydání. Praha: TRITON, 2004. 426 s. ISBN 80-7254-475-
- 24) ODENTHAL, M., et al. Analysis of microsatellite instability in colorectal carcinoma by microfluidic-based chip electrophoresis. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 2009, 62, [cit. 2011-03-22]. Dostupný z WWW: <<http://jcp.bmjournals.com/content/62/9/850.full.pdf>>. ISSN 1472-4146
- 25) PASSARGE, Eberhard. *Color Atlas of Genetics*. 3rd edition revised and updated. New York: Thieme, 2007. *Molecular Basis of Genetics*, s. 78. ISBN: 978-3-13-100363-8
- 26) PAWLIK, Timothy M.; RAUT, Chandrajit P.; RODRIGUEZ-BIGAS, Miguel A. *Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. Disease Markers*. 2004, 20, s. 199-206. ISSN 0278-0240
- 27) PRITCHARD, Colin C.; GRADY, William M. *Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice*. *Gut* [online]. 4.9.2010, 60, [cit. 2011-03-20]. Dostupný z WWW: <<http://gut.bmj.com/content/60/1/116.full>>. ISSN 1468-3288
- 28) ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl třetí. 3. inovované vydání*. Brno: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc. [vl. n.], 2002. *Nádorové supresorové geny dědičného polypózního a nepolypózního kolorektálního nádoru*, s. 848-851. ISBN 80-902562-2-8
- 29) SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. *Genetika*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2009. *Genetická podstata rakoviny*, s. 665-689. ISBN 978-80-210-4852-2
- 30) ŠTEKROVÁ, J., et al. *Familiární adenomatózní polypóza - novinky v molekulární diagnostice*. *Klinická onkologie*. 2006, 19, s. 63-66. Dostupný také z WWW: <http://www.linkos.cz/odbornici/vzdelavani/supp_06/06.pdf>
- 31) TROJAN, Stanislav, et al. *Lékařská fyziologie*. 4. doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2003. *Fyziologie trávení a vstřebávání*, s. 367-368. ISBN 80-247-0512-5
- 32) VYZULA, Rostislav. *Kolorektální karcinom - vedoucí pozice v incidenci na světě, významný zdravotní problém České republiky. Farmakoterapie - speciální příloha : Kolorektální karcinom 2009* [online]. *Září 2009*, roč. 5, [cit. 2011-03-08]. Dostupný z WWW: <<http://www.mojemedicina.cz/files/leciva/jine-soubory/avastin/farmakoterapie.pdf>>. ISSN 1801-1209

- 33) ZAVORAL, Miroslav. Screening sporadického kolorektálního karcinomu. [online]. 12.2.2007, [cit. 2011-03-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.mou.cz/cz/screening-sporadickeho-kolorektalniho-karcinomu/article.html?id=282>>

7. Seznam zkratek

- CIMP - hypermethylace DNA
- CIN - chromosomová instabilita
- CRC - kolorektální karcinom
- DNA - deoxyribonukleová kyselina
- EGF - epidermální růstový faktor
- EGFR - receptor pro epidermální růstový faktor
- FAP - familiální adenomatosní polyposa
- FSS - flexibilní sigmoideoskopie
- HNPCC - hereditární nepolyposní karcinom tlustého střeva
- LOH - ztráta heterozygosity
- MAP- *MYH* asociovaná polyposa
- MSI - mikrosatelitová instabilita
- MSI-H - vysoká mikrosatelitová instabilita
- MSI-L - nízká mikrosatelitová instabilita
- MSS - mikrosatelitová stabilita
- NT - normální tkáň
- PCR - polymerasová řetězová reakce
- RFLP - polymorfismus délky restrikčních fragmentů
- SNP - jednonukleotidový polymorfismus
- TOKS - test na okultní krvácení do stolice
- TU - tumor
- VNTR - tandemové repetice variabilního počtu

8. Seznam obrázků

Obrázek 1 - tlusté střevo a jeho poloha vůči tenkému střevu	8
Obrázek 2 - časový vývoj incidence a mortality CRC v ČR	14
Obrázek 3 - srovnání incidence v ČR s ostatními zeměmi světa	14
Obrázek 4 - srovnání incidence CRC u českých žen s ostatními zeměmi světa.....	15
Obrázek 5 - regionální incidence CRC v ČR.....	15
Obrázek 6 - klasický Fearon-Vogelsteinův model kolorektální karcinogenese	20
Obrázek 7 - mikrosatelitová instabilita v lokusu D18S35	37
Obrázek 8 - mikrosatelitová instabilita v lokusu D18S35	37
Obrázek 9 - ztráta heterozygosity v lokusu D5S299.....	38
Obrázek 10 - ztráta heterozygosity v lokusu D5S346.....	38
Obrázek 11 - ztráta heterozygosity v lokusu D18S35	39
Obrázek 13 - mikrosatelitová instabilita v lokusech BAT 25, BAT 26 a BAT 40	40

9. Seznam grafů

Graf 1 - srovnání frekvence MSI a LOH.....	33
Graf 2 - frekvence MSI.....	34
Graf 3 - frekvence LOH.....	34

10. Seznam tabulek

Tabulka 1 - přehled námi používaných lokusů	26
Tabulka 2 - složení Master Mixu pro PCR.....	29
Tabulka 3 - složení Master Mixu pro PCR.....	30
Tabulka 4 - frekvence LOH a MSI tumor-supresorových genů v CRC.....	34
Tabulka 5 - MSI tumory	35
Tabulka 6 - MSS tumory	36
Tabulka 7 - tumory s LOH.....	36
Tabulka 8 - nález homozygosity v daných lokusech.....	36