

ONKOLOGIE V KLINICKÉ PRAXI

Standardní přístupy v diagnostice
a léčbě vybraných zhoubných nádorů

4., přepracované a doplněné vydání

Jan Novotný
Pavel Vítek
Zdeněk Kleibl
a kolektiv

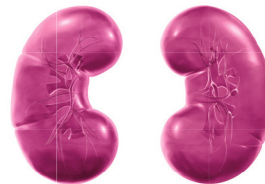


Váš partner
v personalizované léčbě
onkologických pacientů

AstraZeneca 

Zaměřeno na

první linii pokročilého renálního karcinomu



Lenvatinib je v kombinaci s pembrolizumabem hrazen v první linii u dospělých pacientů s pokročilým, inoperabilním nebo metastatickým světlobuněčným renálním karcinomem se střední nebo špatnou prognózou.

Celé znění indikačního omezení najdete na: www.sukl.cz

Zkrácená informace pro preskripci:

Kisplyx 4 mg tvrdé tobolky, Kisplyx 10 mg tvrdé tobolky

Složení: lenvatinibum (ve formě lenvatinibi mesilas). Charakteristika: Lenvatinib je inhibitor receptorové tyrosinkinázy (RTK), který selektivně inhibuje kinázovou aktivitu receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (KDR) a VEGFR3 (FLT4), kromě jiných RTK souvisejících s proangiogenní a onkogenní dráhou, včetně receptorů pro růstový faktor pro fibroblasty FGFR1, 2, 3 a 4, receptoru pro růstový faktor pro krevní destičky PDGFR α , KIT a RET. Indikace: Přípravek Kisplyx je indikován k léčbě dospělých pacientů s pokročilým karcinomem ledvin v kombinaci s pembrolizumabem v první linii léčby. V kombinaci s everolimem po jedné předcházející léčbě cílené na vaskulární endoteliální růstový faktor. Kontraindikace: Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku. Kojení. Dávkování: Kisplyx v kombinaci s pembrolizumabem v první linii léčby. Doporučená dávka lenvatinibu je 20 mg (dvě 10mg tobolky) perorálně jednou denně v kombinaci s pembrolizumabem buď 200 mg každé 3 týdny nebo 400 mg každých 6 týdnů podávaném ve formě intravenózní infuze po dobu 30 minut. Denní dávka lenvatinibu má být upravena dle potřeby podle plánu řízení dávky/toxicity. Léčba lenvatinibem má pokračovat do progresu onemocnění nebo nepříjemné toxicity. Léčba pembrolizumabem má pokračovat do progresu onemocnění, nepříjemné toxicity nebo po maximální délku léčby, jak je uvedeno pro pembrolizumab. Kisplyx v kombinaci s everolimem jako druhá linie léčby. Doporučená denní dávka lenvatinibu je 18 mg (jedna 10mg tobolka a dvě 4mg tobolky) perorálně jednou denně v kombinaci s 5 mg everolimem jednou denně. Denní dávky lenvatinibu a, pokud je to nezbytné, everolimem mají být upraveny dle potřeby podle plánu řízení dávky/toxicity. Podrobné údaje k dávkování, úpravě či odložení dávky viz Souhrn údajů o přípravku. Interakce: Současné podání lenvatinibu, karboplatiny a paklitaxelu nemělo žádný významný vliv na farmakokinetiku jakékoli z těchto 3 látek. U pacientů s RCC nebyla navíc farmakokinetika lenvatinibu významně ovlivněna současným podáváním everolimem. Klinická studie lékových interakcí u pacientů s rakovinou ukázala, že plazmatické koncentrace midazolamu (citlivý substrát CYP3A a Pgp) se v přítomnosti lenvatinibu nezměnily. U pacientů s RCC nebyla navíc farmakokinetika everolimem významně ovlivněna. Nežádoucí účinky: Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky (které se vyskytly u $\geq 30\%$ pacientů) byly průjem (61,8 %), hypertenze (51,5 %), únava (47,1 %), hypotyreóza (45,1 %), snížená chuť k jídlu (42,1 %), nauzea (39,6 %), stomatitida (36,6 %), proteinurie (33,0 %), dysfonie (32,8 %) a artralgie (32,4 %).

Upozornění: Před zahájením léčby lenvatinibem je nutné zajistit adekvátní kontrolu krevního tlaku a, pokud je známo, že pacient má hypertenzi, má být takový pacient léčen stabilní dávkou antihypertenziv po dobu alespoň 1 týdne před léčbou lenvatinibem. Byly hlášeny závažné komplikace nedostatečně kontrolované hypertenze, včetně aortální disekce. Je důležité včasné zjištění a účinná léčba hypertenze, aby byla minimalizována potřeba přerušit léčbu a snížit dávku lenvatinibu. U pacientů léčených lenvatinibem byla zaznamenána proteinurie. Je třeba pravidelně sledovat množství bílkovin v moči. Bude-li testovací průzkem indikovat proteinurii $\geq 2+$, může být nutné přerušit léčbu, upravit dávkování nebo léčbu zcela ukončit. U pacientů s těžkou poruchou funkce ledvin je nutné počáteční dávku lenvatinibu upravit. Lenvatinib narušuje exogenní supresi štítné žlázy. Je třeba pravidelně kontrolovat hladiny tyreostimulačního hormonu (thyroid stimulating hormone, TSH) a upravit podávání tyreoidálních hormonů, aby se dosáhlo přiměřené hladiny TSH podle léčebného cíle pacienta. Ženy ve fertilním věku se musí během léčby lenvatinibem a ještě minimálně jeden měsíc po ukončení terapie vyvarovat otěhotnění a musí používat vysoce účinnou antikoncepci. V současné době není známo, zda může lenvatinib snížit účinnost hormonální antikoncepce, a proto mají ženy užívající perorální hormonální antikoncepci používat ještě bariérovou ochranu. Údaje o podávání lenvatinibu těhotným ženám nejsou k dispozici. Lenvatinib byl embryotoxický a teratogenní při podání potkanům a králíkům. Není známo, zda se lenvatinib vylučuje do lidského mateřského mléka. Lenvatinib a jeho metabolity se vylučují do mateřského mléka potkanů. Riziko pro kojné novorozence nebo děti nelze vyloučit, a proto je podávání lenvatinibu v období kojení kontraindikováno. Lenvatinib má kvůli nežádoucím účinkům, jako jsou únava a závrať, malý vliv na schopnost řídit nebo obsluhovat stroje. Pacienti, u kterých se vyskytnou tyto příznaky, mají při řízení nebo obsluze strojů dbát zvýšené opatrnosti. Podrobné údaje viz Souhrn údajů o přípravku. Podmínky uchovávání: Neuchovávejte při teplotě nad 25 °C. Uchovávejte v původním blistru, aby byl přípravek chráněn před vlhkostí. Výdej přípravku je vázán na lékařský předpis. Datum poslední revize SPC: 03/2024. Registrační číslo: EU/1/16/1128/002 EU/1/16/1128/001. Držitel rozhodnutí o registraci: Eisai GmbH, Edmund-Rumpler-Strasse 3, 60549 Frankfurt am Main, Německo. Podrobnější údaje najdete v příbalové informaci. Souhrnu údajů o přípravku, nebo jsou k dispozici na adrese Eisai GesmbH organizační složka, Holušícká 2253/1, 148 00 Praha 4 – Chodov tel. +420 242 485 839, kontakt_praha@eisai.net. Přípravek je hrazen ze zdravotního pojištění s omezením. Před předepsáním se seznáme s aktuálním zněním indikačních omezení.

**Děkujeme společnostem, které v této publikaci inzerují
nebo její vydání jiným způsobem podpořily
(v abecedním pořadí):**

Amgen s.r.o.

AstraZeneca Czech Republic s.r.o.

Centrum pro rozvoj paliativní péče, z.ú.

Eisai GesmbH, organizační složka

GlaxoSmithKline, s.r.o.

Klub mladých onkologů, z.s.

Merck spol. s r.o.

Merck Sharp & Dohme s.r.o.

SERVIER s.r.o.

STADA PHARMA CZ s.r.o.

ONKOLOGIE V KLINICKÉ PRAXI

Standardní přístupy v diagnostice
a léčbě vybraných zhoubných nádorů

4., přepracované a doplněné vydání

Jan Novotný
Pavel Vítek
Zdeněk Kleibl
a kolektiv

Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude **trestně stíháno**.

Automatizovaná analýza textů nebo dat ve smyslu čl. 4 směrnice 2019/790/EÚ a použití této knihy k trénování AI jsou **bez souhlasu nositele práv zakázány**.

**doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D., MUDr. Pavel Vítek, Ph.D., MBA,
prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D., a kolektiv**

ONKOLOGIE V KLINICKÉ PRAXI

Standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů

4., přepracované a doplněné vydání

Editoři:

doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D.

Sunderby sjukhus, Sweden

Institut klinické a experimentální medicíny

MUDr. Pavel Vítek, Ph.D., MBA

Proton Therapy Center Czech,

Praha

prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní

diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Kolektiv autorů:

MUDr. Dagmar Adámková Krákorová, Ph.D.

prof. MUDr. Monika Arenbergerová, Ph.D.

prof. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

MUDr. Jana Čejková

MUDr. Richard Feranec, Ph.D.

MUDr. Soňa Fraňková, Ph.D.

doc. MUDr. Ondřej Havránek, Ph.D.

Mgr. et MUDr. Petra Holečková, Ph.D., MBA

MUDr. Jarmila Kissová, Ph.D.

prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

MUDr. Věra Krutílková

MUDr. Zdeněk Linke

MUDr. Radim Němeček, Ph.D.

prof. MUDr. David Pavlišta, Ph.D.

doc. RNDr. Ladislav Pecen, CSc.

MUDr. Petr Pospíšil, Ph.D.

MUDr. Silvie Rajnochová Bloudíčková, Ph.D., DBA

MUDr. Jana Selucká

MUDr. Ondřej Sláma, Ph.D.

doc. MUDr. Pavel Taimr, Ph.D.

MUDr. Veronika Veškrňová, Ph.D.

MUDr. Pavel Vítek, Ph.D., MBA

doc. MUDr. Milan Vošmik, Ph.D.

MUDr. Petra Vysočanová

doc. MUDr. Milada Zemanová, Ph.D.

MUDr. Petra Zemanová

MUDr. Martina Zimovjanová, Ph.D.

doc. MUDr. David Zogala, Ph.D.

Recenzent:

prof. MUDr. Samuel Vokurka, Ph.D.

Onkologická a radioterapeutická klinika Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň

Centrum paliativní a podpůrné medicíny Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni

Sekce podpůrné léčby a péče České onkologické společnosti ČLS JEP

Kapitoly 1.1–1.5 byly podpořeny Projektem Národního ústavu pro výzkum rakoviny LX22NPO5102, financováno Evropskou unií, Program podpory excelentního výzkumu v prioritních oblastech veřejného zájmu ve zdravotnictví – EXCELES.

Vydání odborné knihy schválila Vědecká redakce nakladatelství Grada Publishing, a.s.

Obrázky dodali autoři. Obrázky 2.1, 2.2, 2.7, 2.8, 2.10, 2.18, 2.12, 2.13, 2.14, 3.5 překreslil a upravil Jiří Hlaváček.

Cover Design © Grada Publishing, a.s., 2024

© Grada Publishing, a.s., 2024

Vydala Grada Publishing, a.s.

U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 9756. publikaci

Šéfredaktorka lékařské literatury MUDr. Michaela Lízlerová

Odpovědná redaktorka BcA. Radka Jančová, DiS.

Jazyková korektura Klára Chouliková

Sazba a zlom Antonín Plicka

Počet stran 574

4. vydání (v Gradě 1.), Praha 2024

Vytiskla D.R.J. TISKÁRNA RESL, s.r.o., Náchod

Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o léčích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění však pro autory ani pro nakladatelství nevyplynou žádné právní důsledky.

ISBN 978-80-271-7569-7 (pdf)

ISBN 978-80-271-3918-7 (print)

Editori

doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D.

Sunderby sjukhus, Sweden

Institut klinické a experimentální medicíny

MUDr. Pavel Vítek, Ph.D., MBA

Proton Therapy Center Czech, Praha

prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky

1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Kolektiv autorů

MUDr. Dagmar Adámková Krákorová, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče Masarykova onkologického ústavu a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Brno

prof. MUDr. Monika Arenbergerová, Ph.D.

Dermatovenerologická klinika 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

prof. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

Onkologická klinika 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole

MUDr. Jana Čejková

Onkologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní Thomayerovy nemocnice

MUDr. Richard Feranec, Ph.D.

Oddělení gynekologické onkologie Kliniky operační onkologie Masarykova onkologického ústavu a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Brno

MUDr. Soňa Fraňková, Ph.D.

Klinika hepatogastroenterologie Institutu klinické a experimentální medicíny

doc. MUDr. Ondřej Havránek, Ph.D.

BIOCEV 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

MUDr. et Mgr. Petra Holečková, Ph.D., MBA

Ústav radiační onkologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Bulovka

MUDr. Jarmila Kissová, Ph.D.

Oddělení klinické hematologie a Interní hematologická a onkologická klinika Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice Brno

prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky

1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

MUDr. Věra Krutílková

Ambulance klinické genetiky Agel a.s., Praha a Nový Jičín

MUDr. Zdeněk Linke

Onkologická klinika 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole

MUDr. Radim Němeček, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče Masarykova onkologického ústavu a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity

prof. MUDr. David Pavlišta, Ph.D.

Centrum onkologické prevence Onkogynekologického centra Kliniky gynekologie, porodnictví a neonatologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

doc. RNDr. Ladislav Pecen, CSc.

Centrální laboratoř pro imunoanalýzu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni

Ústav informatiky Akademie věd České republiky

MUDr. Petr Pospíšil, Ph.D.

Klinika radiační onkologie Masarykova onkologického ústavu a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity

MUDr. Silvie Rajnochová Bloudíčková, Ph.D. DBA

Klinika nefrologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Nefrologická ambulance Institutu klinické a experimentální medicíny

MUDr. Jana Selucká

Klinika hepatogastroenterologie Institutu klinické a experimentální medicíny

MUDr. Ondřej Sláma, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče Masarykova onkologického ústavu a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity

doc. MUDr. Pavel Taimr, Ph.D.

Klinika gastroenterologie Institutu klinické a experimentální medicíny

MUDr. Veronika Veškrňová, Ph.D.

Dermatovenerologická klinika 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

MUDr. Pavel Vítek, Ph.D., MBA

Ústav radiační onkologie
Fakultní nemocnice na Bulovce

doc. MUDr. Milan Vošmik, Ph.D.

Klinika onkologie a radioterapie Lékařské fakulty Univerzity
Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové

MUDr. Petra Vysočanová

Ústav lékařské etiky Lékařské fakulty Masarykovy univerzity

doc. MUDr. Milada Zemanová, Ph.D.

Onkologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

MUDr. Petra Zemanová

Onkologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze
Klinika tuberkulózy a respiračních nemocí 1. lékařské
fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

MUDr. Martina Zimovjanová, Ph.D.

Onkologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

doc. MUDr. David Zogala, Ph.D.

Ústav nukleární medicíny 1. lékařské fakulty Univerzity
Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Recenzent

prof. MUDr. Samuel Vokurka, Ph.D.

Onkologická a radioterapeutická klinika Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň
Centrum paliativní a podpůrné medicíny Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni
Sekce podpůrné léčby a péče České onkologické společnosti ČLS JEP

VÍCE ZÍTKŮ pro pacienty s renálním karcinomem¹



Zkrácená informace o léčivém přípravku

Název přípravku: KEYTRUDA® 25 mg/ml koncentrát pro infuzní roztok. **Kvalitativní a kvantitativní složení:** Injekční lahvička se 4 ml koncentrátu obsahuje 100 mg pembrolizumabu. **Pomocné látky:** Sacharóza, histidin, polysorbát 80, monohydrát histidin-hydrochloridu, voda pro injekci. **Indikace:** Přípravek KEYTRUDA je indikován: 1. v monoterapii u dospělých a dospívajících ve věku 12 let a starších s pokročilým (neresekovatelným nebo metastazujícím) melanomem; 2. v monoterapii k adjuvantní léčbě dospělých a dospívajících ve věku 12 let a starších s melanomem stadia IIB, IIC nebo III, kteří podstoupili kompletní resekci; 3. v kombinaci s chemoterapií obsahující platinu v neoadjuvantní léčbě a následně v monoterapii v adjuvantní léčbě u resekovatelného nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) s vysokým rizikem recidivy u dospělých; 4. v monoterapii k adjuvantní léčbě dospělých s NSCLC, kteří mají vysoké riziko recidivy po kompletní resekci a léčbě chemoterapií na bázi platinu; 5. v monoterapii v první linii u metastazujícího NSCLC u dospělých, jejichž nádory exprimují PD-L1 se skóre nádorového podílu (TPS) $\geq 50\%$ bez pozitivních nádorových mutací EGFR nebo ALK; 6. v kombinaci s chemoterapií pemtetrexemem a platinou v první linii u metastazujícího neskvamózního NSCLC u dospělých, jejichž nádory nevykazují pozitivní mutace EGFR nebo ALK; 7. v kombinaci s karboplatinou a (na)paklitaxelem v první linii u metastazujícího skvamózního NSCLC u dospělých; 8. v monoterapii u lokálně pokročilého nebo metastazujícího NSCLC u dospělých, jejichž nádory exprimují PD-L1 s TPS $\geq 1\%$, a kteří již byli léčeni nejmenším jedním chemoterapeutickým režimem. Pacienti s pozitivními nádorovými mutacemi EGFR nebo ALK musí být také předtím, než dostanou přípravek KEYTRUDA, léčeni cílenou terapií; 9. v monoterapii u dospělých a pediatrických pacientů od 3 let s relabujícím nebo refrakterním klasickým Hodgkinovým lymfomem, u nichž selhala autologní transplantace kmenových buněk (ASCT), nebo byli léčeni alespoň dvěma předchozími terapiemi, přičemž ASCT není možností léčby; 10. v monoterapii u lokálně pokročilého nebo metastazujícího uroteliálního karcinomu u dospělých, kteří již byli léčeni chemoterapií obsahující platinu; 11. v monoterapii u lokálně pokročilého nebo metastazujícího uroteliálního karcinomu u dospělých, u kterých není chemoterapie obsahující cisplatinu vhodná a u kterých nádory vykazují expresi PD-L1 s kombinovaným pozitivním skóre (CPS) ≥ 10 ; 12. v kombinaci s enfortumabem vedotinem v první linii u neresekovatelného nebo metastazujícího uroteliálního karcinomu u dospělých; 13. v monoterapii nebo v kombinaci s chemoterapií platinou a fluoruracilem (5-FU) v první linii u metastazujícího nebo neresekovatelného recidivujícího skvamózního karcinomu hlavy a krku (HNSCC) u dospělých, jejichž nádory exprimují PD-L1 s TPS $\geq 50\%$ a kteří progredují při chemoterapii obsahující platinu nebo po ní; 15. v kombinaci s axitinibem v první linii u pokročilého renálního karcinomu (RCC) u dospělých; 16. v kombinaci s lenvatinibem v první linii u pokročilého RCC u dospělých; 17. v monoterapii k adjuvantní léčbě dospělých s RCC se zvýšeným rizikem recidivy po nefrektomii nebo po nefrektomii a resekci metastatických lézí; 18. Nádory MSI-H/dMMR. **Kolorektální karcinom (CRC), v monoterapii pro dospělé s MSI-H nebo dMMR CRC:** – v první linii u metastazujícího CRC, – po předchozí kombinované léčbě založené na fluoropyrimidinu u neresekovatelného nebo metastazujícího CRC, **Nádory kromě CRC, v monoterapii u následujících MSI-H nebo dMMR nádorů u dospělých s:** – pokročilým nebo recidivujícím endometriálním karcinomem, u kterých došlo k progresi onemocnění při nebo po předchozí léčbě založené na platině v jakémkoli režimu léčby a kteří nejsou kandidáty pro kurativní chirurgickou léčbu nebo radioterapii, – neresekovatelnými nebo metastazujícími nádory žaludku, tenkého střeva nebo žlučových cest, u kterých došlo k progresi onemocnění během nebo po alespoň jedné předchozí léčbě; 19. v kombinaci s chemoterapií na bázi platinu a fluoropyrimidinu v první linii u lokálně pokročilého neresekovatelného nebo metastazujícího karcinomu jícnu u dospělých, jejichž nádory exprimují PDL1 s CPS ≥ 10 ; 20. v kombinaci s chemoterapií v neoadjuvantní léčbě a následně po chirurgické léčbě v monoterapii v adjuvantní léčbě u dospělých s lokálně pokročilým nebo časným stadiem triplenegativního karcinomu prsu (TNBC) s vysokým rizikem recidivy; 21. v kombinaci s chemoterapií u lokálně rekurentního neresekovatelného nebo metastazujícího TNBC u dospělých, jejichž nádory exprimují PDL1 s CPS ≥ 10 a kteří dosud nebyli léčeni chemoterapií pro metastatické onemocnění; 22. v kombinaci s lenvatinibem u pokročilého nebo rekurentního endometriálního karcinomu u dospělých, u nichž došlo k progresi onemocnění během předchozí léčby terapií obsahující platinu v jakémkoli režimu nebo po ní a kteří nejsou kandidáty na kurativní chirurgickou léčbu nebo radioterapii; 23. v kombinaci s chemoterapií s nebo bez bevacizumabu u perzistentního, recidivujícího nebo metastazujícího karcinomu děložního hrdla u dospělých, jejichž nádory exprimují PD-L1 s CPS ≥ 1 ; 24. v kombinaci s trastuzumabem, fluoropyrimidinem a chemoterapií obsahující platinu v první linii u lokálně pokročilého neresekovatelného nebo metastazujícího HER2-positivního adenokarcinomu žaludku nebo gastroezofageální juncture u dospělých, jejichž nádory exprimují PD-L1 s CPS ≥ 1 ; 25. v kombinaci s chemoterapií obsahující fluoropyrimidin a platinu v první linii u lokálně pokročilého neresekovatelného nebo metastazujícího HER2-negativního adenokarcinomu žaludku nebo gastroezofageální juncture u dospělých, jejichž nádory exprimují PD-L1 s CPS ≥ 1 ; 26. v kombinaci s gemcitabinem a cisplatinou v první linii u lokálně pokročilého neresekovatelného nebo metastazujícího karcinomu žlučových cest u dospělých. **Dávkování**

a způsob podání: Doporučená dávka přípravku KEYTRUDA u dospělých je 200 mg každé 3 týdny nebo 400 mg každých 6 týdnů. Doporučená dávka přípravku KEYTRUDA v monoterapii u pediatrických pacientů ve věku od 3 let výše s CHL nebo pacientů od 12 let výše s melanomem je 2 mg/kg tělesné hmotnosti (bw - bodyweight) (až do maximální dávky 200 mg) každé 3 týdny. Dávka se podává intravenózní infúzí po dobu 30 minut. Při podávání přípravku KEYTRUDA v rámci kombinace s chemoterapií je nutno přípravek KEYTRUDA podávat první. Při podávání přípravku KEYTRUDA v rámci kombinace s enfortumabem vedotinem má být přípravek KEYTRUDA podáván po enfortumabem vedotinou, pokud jsou podány ve stejný den. Pacienti je nutno přípravkem KEYTRUDA léčit do progresie nemoci nebo do vzniku nepříjemné toxicity (a až po maximální dobu trvání léčby, pokud je to pro indikaci specifikováno). Bly pozorovány atypické odpovědi (tj. počáteční přechodné zvětšení nádoru nebo vznik nových malých lézí během prvních několika měsíců, následované zmenšením nádoru). Klinicky stabilní pacienti s počátečními známkami progresie nemoci se doporučuje léčit dál, dokud se progresie nepotvrdí. Další podrobné informace ohledně dávkování a trvání léčby v jednotlivých indikacích uvidíte Souhrn údajů o přípravku (SPC). Dávkování přípravku v kombinaci s pembrolizumabem viz SPC pro souběžně použitá léčiva. **Zvláštní upozornění:** Vyhodnocení stavu PD-L1: Při hodnocení stavu tumoru s ohledem na PD-L1 je důležité zvolit dobře validovanou a robustní metodu. Aby se zlepšila sledovatelnost biologických léčivých přípravků, má se přehledně zaznamenat název podaného přípravku a číslo šarže. **Imunitně zprostředkované nežádoucí účinky:** U pacientů, kterým byl podáván pembrolizumab, se vyskytly imunitně zprostředkované nežádoucí účinky, včetně závažných a fatálních, většina z nich byla reverzibilní a zvláště se přerušením podávání pembrolizumabu, podáním kortikosteroidů a/nebo podpůrnou léčbou. Mohou se vyskytnout nežádoucí účinky postihující současně více tělesných systémů, např. pneumonitida, kolitida, hepatitida, nefritida, endokrinopatie, kožní nežádoucí účinky, další nežádoucí účinky podrobně uvedeny v SPC. Pembrolizumab musí být trvale vysazen při jakémkoli imunitně zprostředkovaném nežádoucím účinku stupně 3, který se opakuje, nebo při jakémkoli imunitně zprostředkovaném nežádoucím toxicitě stupně 4, kromě endokrinopatií, které jsou zvládnuty hormonální substitucí. Pembrolizumab může být znovu nasazen během 12 týdnů po poslední dávce přípravku KEYTRUDA, pokud se nežádoucí účinek zlepšil na stupeň ≤ 1 a dávka kortikosteroidů byla redukována na ≤ 10 mg prednisonu nebo jeho ekvivalentu za den. Léčba pembrolizumabem může u příjemců transplantovaných solidních orgánů zvýšit riziko rejekce, je nutné zvážit benefit/risk. U pacientů s CHL, podstupujících alogenní transplantaci kostní dřeně, byly pozorovány případy GVHD a VOD. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku. **Interakce:** Nebyly provedeny žádné formální farmakokinetické studie lékových interakcí. Pembrolizumab se odstraňuje z oběhu katabolizací, žádné metabolické lékové interakce se nepředpokládají. Před nasazením pembrolizumabu je nutno se vyhnout podávání systémových kortikosteroidů nebo imunosupresiv, a to kvůli jejich potenciálnímu vlivu na farmakodynamickou aktivitu a účinnost pembrolizumabu. Systémové kortikosteroidy nebo jiná imunosupresiva však lze používat po nasazení pembrolizumabu k léčbě imunitně zprostředkovaných nežádoucích účinků. **Těhotenství, kojení:** Údaje o podávání pembrolizumabu těhotným ženám nejsou k dispozici. Ženy ve fertilním věku musí během léčby a nejméně 4 měsíce po poslední dávce pembrolizumabu používat účinnou antikoncepci. Není známo, zda se pembrolizumab vylučuje do lidského mateřského mléka. Je nutno se rozhodnout, zda přerušit kojení nebo vysadit pembrolizumab. **Nežádoucí účinky:** Velmi časté ($\geq 1/10$): infekce močových cest, anémie, neutropenie, trombocytopenie, hypotyreóza, snížení chuti k jídlu, hypokalémie, insomnie, bolest hlavy, periferní neuropatie, dysgezie, hypertenze, dyspnoe, kašel, dysfonie, průjem, bolest břicha, nauzea, zvracení, zácpa, vyrážka, pruritus, alopecie, muskuloskeletální bolest, myozitida, artralgie, bolest v končetině, únava, astenie, edém, pyrexie, zvýšení ALT, AST, lipázy a kreatininu v krvi; Časté ($\geq 1/100$ až $< 1/10$): pneumonie, leukopenie, lymfopenie, febrilní neutropenie, reakce spojená s infúzí, hypertyreóza, tyreoiditida, adrenální insuficience, hypokalémie, hyponatremie, závrat, letargie, suché oko, srdeční arytmie (včetně fibrilace síní), pneumonitida, kolitida, pankreatitida, gastritida, suchá ústa, hepatitida, těžké kožní reakce, suchá kůže, erytém, vitiligo, ekzém, akneiformní dermatitida, artritida, nefritida, akutní poškození ledvin, onemocnění podobné chřipce, zimnice, hyperkalcémie, zvýšení ALP, bilirubinu a amylázy v krvi. Údána vždy nejvyšší frekvence výskytu. Přípravek KEYTRUDA, v monoterapii nebo v kombinované terapii, je nutno trvale vysadit při nežádoucích účincích stupně 4 nebo recidivujících imunitně zprostředkovaných nežádoucích účincích stupně 3, pokud není v tabulce 1 SPC uvedeno jinak. Podrobnější informace o výskytu a úpravách dávky při léčbě v monoterapii nebo v kombinaci s chemoterapií, axitinibem, lenvatinibem či enfortumabem vedotinem viz SPC přípravků. Při hematologické toxicitě stupně 4, pouze u pacientů s CHL, se přípravek KEYTRUDA musí vysadit do zlepšení nežádoucích účinků na stupeň 0 až 1. **Upozornění:** Pembrolizumab může mít mírný vliv na schopnost řídit motorová vozidla a obsluhovat stroje. Po podání pembrolizumabu byla hlášena únava. **Doba použitelnosti:** 2 roky. Z mikrobiologického hlediska má být přípravek, jakmile se naředí, použit okamžitě. Není-li použit okamžitě, chemická a fyzikální stabilita přípravku po otevření před použitím byla prokázána na dobu 96 hodin při 2 až 8 °C. **Uchovávání:** Uchovávejte v chladničce (2 až 8 °C). **Balení:** Jedna 10ml injekční lahvička se 4 ml koncentrátu obsahuje 100 mg pembrolizumabu. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Merck Sharp & Dohme B.V., Waarderweg 39, 2031 BN Haarlem, Nizozemsko. **Registrační číslo:** EU/1/15/1024/002. **Datum poslední revize textu:** 29. 8. 2024. RČN 000026556-CZ. **Způsob výdeje:** Vážen na lékařský předpis. **Způsob úhrady:** Léčivý přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění (indikace 1,2,5,6,7,9,10,13,16,17,18-pouze MSI-H/dMMR metastazující CRC v 1. linii,20,21,22,23) více na www.sukl.cz.

Dříve než přípravek předepíšete, seznáňte se prosím s úplným souhrnem údajů o přípravku, který naleznete na stránkách Evropské agentury pro léčivé přípravky <http://ema.europa.eu/> nebo u zástupce držitele rozhodnutí o registraci v ČR: Merck Sharp & Dohme s.r.o., Na Valentince 3336/4, 150 00 Praha 5 – Česká republika, tel.: +420 233 010 111, dpor_czechslovak@merck.com, www.msd.cz

Reference: 1. SPC KEYTRUDA®, www.sukl.cz.

Předmluva	XIII
1 Preklinická část	1
1.1 Základní charakteristiky nádorových onemocnění (<i>Zdeněk Kleibl</i>)	1
1.2 Poruchy genomu způsobující nádorová onemocnění (<i>Zdeněk Kleibl</i>)	5
1.2.1 Typy a příčiny poškození genomové DNA	5
1.2.2 DNA reparační pochody	9
1.2.3 Epigenetické změny	17
1.2.4 Analýza alterací DNA	18
1.3 Poruchy proliferace nádorových buněk (<i>Zdeněk Kleibl</i>)	21
1.3.1 Buněčný cyklus a jeho poruchy	21
1.3.2 Apoptóza a její poruchy	29
1.3.3 Protein P53: společné řízení apoptózy, buněčného cyklu a senescence	33
1.3.4 Poruchy mitogenní signalizace	36
1.4 Změny v nádorovém mikroprostředí (<i>Zdeněk Kleibl</i>)	48
1.4.1 Změny metabolické aktivity a angiogeneze v nádorovém ložisku	49
1.5 Molekulárněgenetické alterace u hematologických malignit (<i>Ondřej Havránek</i>)	51
1.6 Epidemiologie nádorů (<i>Ladislav Pecan</i>)	56
1.7 Metodika klinického výzkumu v onkologii (<i>Ladislav Pecan</i>)	63
1.7.1 Klinické zkoušky	63
1.7.2 Statistické pojmy	67
1.7.3 Prognostické a prediktivní faktory	69
1.7.4 Závěr	70
1.8 Úvod k radioterapii (<i>Pavel Vítek</i>)	71
1.8.1 Účel a postavení radioterapie	71
1.8.2 Ozařované objemy	71
1.8.3 Frakcionace dávek záření	72
1.8.4 Techniky aplikace záření	72
1.8.5 Orgány v riziku	73
1.8.6 Nežádoucí efekty záření	74
1.8.7 Kombinace s chemoterapií	74
1.8.8 Nové přístupy k radioterapii	74
1.9 Úloha PET v onkologii (<i>David Zogala</i>)	75
1.9.1 Princip PET	75
1.9.2 Hlavní témata PET v onkologii	77
2 Klinická část – léčba dle diagnóz	81
2.1 Karcinomy hlavy a krku (C00–14) a karcinom hrtanu (C32) (<i>Pavel Vítek</i>)	81
2.1.1 Základní charakteristika a výskyt onemocnění	81
2.1.2 Rizikové faktory	90
2.1.3 Prognostické faktory	90
2.1.4 Klinické příznaky	90
2.1.5 Diagnostický postup	91
2.1.6 Léčebné postupy dle diagnóz	91
2.1.7 Léčebné postupy – obecné poznámky	96
2.1.8 Léčebná schémata	98
2.1.9 Dispenzarizace	101
2.2 Karcinom jícnu (C15) (<i>Milan Vošmik, Milada Zemanová, Pavel Vítek, Jan Novotný</i>)	107
2.2.1 Základní charakteristika a výskyt onemocnění	107
2.2.2 Rizikové faktory	111
2.2.3 Prognostické faktory	111
2.2.4 Klinické příznaky	111
2.2.5 Diagnostický postup	111
2.2.6 Léčebný postup	112
2.2.7 Léčebná schémata	114
2.2.8 Dispenzarizace	117
2.3 Karcinom žaludku (C16) (<i>Milan Vošmik, Jan Novotný</i>)	119

2.3.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	119	2.7	Karcinom žlučníku a extrahepatálních žlučových cest (C23–24) (<i>Jan Novotný</i>)	180
2.3.2	Rizikové faktory	121	2.7.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	180
2.3.3	Hereditární aspekty	121	2.7.2	Rizikové faktory	183
2.3.4	Prognostické a prediktivní faktory	122	2.7.3	Prognostické a prediktivní faktory	184
2.3.5	Klinické příznaky	122	2.7.4	Klinické příznaky	184
2.3.6	Diagnostický postup	122	2.7.5	Diagnostický postup	184
2.3.7	Léčebný postup	123	2.7.6	Léčebný postup	185
2.3.8	Léčebná schémata	125	2.7.7	Léčebná schémata	188
2.3.9	Dispenzarizace	127	2.7.8	Dispenzarizace	190
2.4	Karcinom tračnicku, rektosigmatu a rekta (C18–20) (<i>Radim Němeček, Petr Pospíšil, Jan Novotný</i>)	129	2.8	Karcinom slinivky břišní (C25) (<i>Jan Novotný, Pavel Vítek</i>)	191
2.4.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	129	2.8.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	191
2.4.2	Rizikové faktory	132	2.8.2	Rizikové faktory	192
2.4.3	Hereditární aspekty	133	2.8.3	Hereditární aspekty	192
2.4.4	Prognostické faktory	134	2.8.4	Prognostické faktory	193
2.4.5	Klinické příznaky	134	2.8.5	Klinické příznaky	193
2.4.6	Diagnostický postup	135	2.8.6	Diagnostický postup	194
2.4.7	Léčebný postup pro karcinom tračnicku a rektosigmatu stadií I, II a III	135	2.8.7	Léčebný postup	194
2.4.8	Léčebný postup pro karcinom rekta, stadia I, II, III	141	2.8.8	Cystické léze pankreatu	200
2.4.9	Léčba metastatického karcinomu tračnicku, rektosigmatu a rekta (mCRC)	145	2.8.9	(Peri)ampulární karcinom	201
2.4.10	Léčebná schémata	154	2.8.10	Léčebná schémata	201
2.5	Karcinom anu (C21) (<i>Pavel Vítek, Jan Novotný</i>) ...	158	2.8.11	Dispenzarizace	205
2.5.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	158	2.9	Gastrointestinální stromální nádory (<i>Jan Novotný, Zdeněk Linke</i>)	207
2.5.2	Rizikové faktory	158	2.9.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	207
2.5.3	Prognostické faktory	160	2.9.2	Rizikové faktory	207
2.5.4	Klinické příznaky	160	2.9.3	Prognostické a prediktivní faktory	209
2.5.5	Diagnostický postup	160	2.9.4	Klinické příznaky	209
2.5.6	Léčebný postup	160	2.9.5	Diagnostický postup	210
2.5.7	Léčebná schémata	164	2.9.6	Léčebný postup	210
2.5.8	Dispenzarizace	165	2.9.7	Léčebná schémata	216
2.6	Hepatocelulární karcinom (C22) (<i>Soňa Fraňková, Pavel Taimr, Jan Novotný</i>)	167	2.9.8	Dispenzarizace	216
2.6.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	167	2.10	Neuroendokrinní nádory (<i>Pavel Vítek, Jan Novotný, Věra Krutílková</i>)	218
2.6.2	Rizikové faktory	169	2.10.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	218
2.6.3	Prognostické faktory	169	2.10.2	Rizikové faktory	223
2.6.4	Klinické příznaky	169	2.10.3	Hereditární aspekty	223
2.6.5	Diagnostický postup	170	2.10.4	Prognostické faktory	225
2.6.6	Léčebný postup	171	2.10.5	Klinické příznaky	225
2.6.7	Léčebná schémata	176	2.10.6	Diagnostický postup	226
2.6.8	Dispenzarizace	178	2.10.7	Léčba lokalizovaných forem	227
			2.10.8	Léčba pokročilého onemocnění	229
			2.10.9	Léčba karcinoidní krize	233
			2.10.10	Léčebná schémata	233
			2.10.11	Dispenzarizace	234

2.11	Nemalobuněčný plicní karcinom (C34) (Milada Zemanová, Petra Zemanová, Pavel Vítek, Jan Novotný)	234	2.14.8	Léčebná schémata	282
2.11.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	234	2.14.9	Dispenzarizace	284
2.11.2	Rizikové faktory	236	2.15	Sarkomy kostí (C40–41) (Dagmar Adámková Krákorová)	286
2.11.3	Odvýkání kouření	237	2.15.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	286
2.11.4	Screening karcinomu plic	237	2.15.2	Rizikové faktory	288
2.11.5	Klinické příznaky	238	2.15.3	Prognostické faktory	288
2.11.6	Diagnostický postup	238	2.15.4	Klinické příznaky	289
2.11.7	Typizace a prognostické faktory, prediktivní molekulární markery	241	2.15.5	Diagnostický postup	289
2.11.8	Léčebný postup	242	2.15.6	Léčba kostních sarkomů	289
2.11.9	Léčebná schémata	250	2.15.7	Systémová léčba – léčebná schémata ...	290
2.11.10	Radioterapie	250	2.15.8	Radioterapie	290
2.11.11	Dispenzarizace	257	2.15.9	Dispenzarizace	291
2.12	Malobuněčný plicní karcinom (C34) (Milada Zemanová, Jan Novotný, Pavel Vítek)	260	2.16	Melanom kůže, slizniční a okulární (C43) (Jan Novotný, Monika Arenbergerová, Pavel Vítek)	291
2.12.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	260	2.16.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	291
2.12.2	Rizikové faktory	260	2.16.2	Rizikové faktory	293
2.12.3	TNM klasifikace	261	2.16.3	Prognostické faktory	294
2.12.4	Prognostické faktory	261	2.16.4	Klinické příznaky	294
2.12.5	Klinické příznaky	261	2.16.5	Diagnostický postup	294
2.12.6	Diagnostický postup	261	2.16.6	Léčebný postup	295
2.12.7	Léčebný postup	261	2.16.7	Léčebná schémata	301
2.12.8	Léčebná schémata	264	2.16.8	Dispenzarizace	304
2.12.9	Radioterapie	264	2.16.9	Slizniční melanom	304
2.12.10	Dispenzarizace	266	2.16.10	Okulární melanom	304
2.13	Mezoteliom pleury (Jan Novotný, Pavel Vítek) ...	268	2.17	Karcinom prsu (C50) (Jan Novotný, Pavel Vítek, David Pavlišta, Martina Zimovjanová)	306
2.13.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	268	2.17.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	306
2.13.2	Rizikové faktory	268	2.17.2	Rizikové faktory	306
2.13.3	Prognostické faktory	270	2.17.3	Hereditární aspekty	309
2.13.4	Klinické příznaky	270	2.17.4	Prognostické faktory	310
2.13.5	Diagnostický postup	270	2.17.5	Klinické příznaky	313
2.13.6	Léčebný postup	272	2.17.6	Diagnostický postup	313
2.13.7	Léčebná schémata	273	2.17.7	Léčebný postup	314
2.13.8	Dispenzarizace	273	2.17.8	Léčebná schémata	332
2.14	Sarkomy měkkých tkání vyjma GIST (C38, 46–49) (Dagmar Adámková Krákorová) ...	275	2.17.9	Dispenzarizace	338
2.14.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	275	2.18	Karcinom děložního hrdla (C53) (Richard Feranec, Pavel Vítek)	342
2.14.2	Rizikové faktory	276	2.18.1	Základní charakteristika a výskyt onemocnění	342
2.14.3	Prognostické faktory	276	2.18.2	Rizikové faktory	344
2.14.4	Klinické příznaky	277	2.18.3	Prognostické faktory	345
2.14.5	Diagnostický postup	277	2.18.4	Klinické příznaky	345
2.14.6	Léčebný postup	277	2.18.5	Diagnostický postup	345
2.14.7	Přehled strategií léčby STS	280	2.18.6	Léčebný postup	345
			2.18.7	Léčebná schémata	350
			2.18.8	Dispenzarizace	352

2.19 Zhoubné nádory děložního těla (C54)	
(Richard Feranec, Pavel Vitek)	352
KARCINOMY DĚLOŽNÍHO TĚLA	352
2.19.1 Základní charakteristika a výskyt	
onemocnění	352
2.19.2 Histopatologická klasifikace (WHO) ...	355
2.19.3 Rizikové faktory	355
2.19.4 Prognostické faktory	355
2.19.5 Klinické příznaky	357
2.19.6 Diagnostický postup	357
2.19.7 Léčebný postup	357
2.19.8 Léčebná schémata	360
2.19.9 Dispenzarizace	361
SARKOMY DĚLOŽNÍHO TĚLA	362
2.19.10 Základní charakteristika a výskyt	
onemocnění	362
2.19.11 Histopatologická klasifikace	
(WHO)	362
2.19.12 Leiomyosarkom těla dělohy	362
2.19.13 Low-grade endometriální	
stromální sarkom	364
2.19.14 High-grade endometriální	
stromální sarkom a nediferencovaný	
uterinní sarkom (UUS)	365
2.19.15 Adenosarkom dělohy	365
2.19.16 Dispenzarizace	366
2.20 Karcinom vaječníků, tuby a primární perito-	
neální karcinom (C56) (Pavel Vitek,	
Jan Novotný, Věra Krutílková)	367
2.20.1 Základní charakteristika a výskyt	
onemocnění	367
2.20.2 Rizikové a protektivní faktory	368
2.20.3 Hereditární aspekty	369
2.20.4 Histopatologický staging	370
2.20.5 Prognostické faktory	372
2.20.6 Klinické příznaky	372
2.20.7 Diagnostický postup	372
2.20.8 Léčebný postup	373
2.20.9 Léčebná schémata	379
2.20.10 Dispenzarizace	379
2.21 Karcinom prostaty (C61) (Pavel Vitek,	
Tomáš Büchler, Jana Čejková)	384
2.21.1 Základní charakteristika a výskyt	
onemocnění	384
2.21.2 Rizikové faktory	386
2.21.3 Screening	386
2.21.4 Prognostické faktory	387
2.21.5 Klinické příznaky	388
2.21.6 Diagnostický postup	388
2.21.7 Léčebný postup – lokalizované	
onemocnění	389
2.21.8 Léčebný postup – generalizované	
onemocnění	393
2.21.9 Léčebná schémata	397
2.21.10 Dispenzarizace	400
2.22 Nádory varlat (C62) (Tomáš Büchler,	
Jan Novotný)	405
2.22.1 Základní charakteristika a výskyt	
onemocnění	405
2.22.2 Rizikové faktory	405
2.22.3 Prognostické faktory	407
2.22.4 Klinické příznaky	407
2.22.5 Diagnostický postup	407
2.22.6 Léčebný postup	408
2.22.7 Léčebná schémata	409
2.22.8 Dispenzarizace	411
2.23 Adenokarcinom ledvin (C64) (Tomáš Büchler,	
Jan Novotný)	413
2.23.1 Základní charakteristika a výskyt	
onemocnění	413
2.23.2 Rizikové faktory	413
2.23.3 Hereditární aspekty	413
2.23.4 Prognostické faktory	415
2.23.5 Klinické příznaky	415
2.23.6 Diagnostický postup	417
2.23.7 Léčebný postup	417
2.23.8 Léčebná schémata	420
2.23.9 Dispenzarizace	421
2.24 Karcinom pánvičky ledvinné, močovodu	
a močového měchýře (C65–68) (Jan Novotný,	
Pavel Vitek)	423
2.24.1 Základní charakteristika a výskyt	
onemocnění	423
2.24.2 Rizikové faktory	423
2.24.3 Prognostické faktory	425
2.24.4 Klinické příznaky	425
2.24.5 Diagnostický postup	425
2.24.6 Léčebný postup	426
2.24.7 Léčebná schémata	429
2.24.8 Dispenzarizace	432
2.25 Nádory CNS (C70–72) (Pavel Vitek)	434
2.25.1 Základní charakteristika a výskyt	
onemocnění	434
2.25.2 Rizikové faktory	436
2.25.3 Prognostické a prediktivní faktory	437
2.25.4 Klinické příznaky	437
2.25.5 Diagnostický postup	438
2.25.6 Léčebné postupy	438

2.25.7 Léčebná schémata	444	3.4.2 Základní charakteristika léčiv používaných v podpůrné léčbě kostních metastáz	482
2.25.8 Dispenzarizace	447	3.4.3 Klinické využití bisfosfonátů	482
2.26 Karcinomatóza peritonea (<i>Pavel Vítek, Jan Novotný</i>)	448	3.4.4 Zásady aplikace bisfosfonátů	487
2.26.1 Základní charakteristika a výskyt onemocnění	448	3.5 Febrilní neutropenie (<i>Jan Novotný, Pavel Vítek</i>) ..	489
2.26.2 Typy karcinomatózy peritonea	448	3.5.1 Prevence výskytu febrilní neutropenie ..	489
2.26.3 Klasifikace	450	3.5.2 Diagnostická vyšetření při epizodě febrilní neutropenie	492
2.26.4 Prognostické faktory	450	3.5.3 Vyhodnocení závažnosti epizody febrilní neutropenie	493
2.26.5 Diagnostický postup	451	3.5.4 Terapie epizody febrilní neutropenie	495
2.26.6 Léčebné postupy	452	3.5.5 Terapie opakovaného výskytu febrilní neutropenie	497
2.26.7 Léčebná schémata	456	3.6 Kožní toxicita molekulární cílené léčby a imunoterapie (<i>Monika Arenbergrová, Veronika Veškrňová, Jan Novotný, Pavel Vítek</i>)	498
2.26.8 Dispenzarizace	456	3.6.1 EGFR inhibitory	499
3 Podpůrná léčba v onkologii	459	3.6.2 VEGF(R) inhibitory	501
3.1 Nevolnost a zvracení (<i>Jan Novotný</i>)	459	3.6.3 mTOR inhibitory	501
3.1.1 Chemoterapií a zářením indukovaná nevolnost a zvracení	459	3.6.4 BRAF inhibitory	501
3.1.2 Terapie nevolnosti a zvracení indukovaných opioidy	467	3.6.5 MEK inhibitory	501
3.1.3 Nevolnost a zvracení z jiných příčin	467	3.6.6 KIT a PDGFR inhibitory	502
3.2 Kardiotoxicita a kardiovaskulární nežádoucí účinky (<i>Petra Vysočanová, Jan Novotný</i>)	468	3.6.7 SMO inhibitory	502
3.2.1 Základní charakteristika problému	468	3.6.8 Inhibitory imunitních kontrolních bodů	502
3.2.2 Kardiotoxicita antracyklinů	470	3.7 Léčba nádorové bolesti (<i>Ondřej Sláma</i>)	503
3.2.3 Kardiotoxicita 5-fluorouracilu a kapecitabinu	471	3.7.1 Hodnocení bolesti	503
3.2.4 Kardiotoxicita paklitaxelu	471	3.7.2 Léčba nádorové bolesti	505
3.2.5 Kardiotoxicita cyklofosfamidů	472	3.8 Výživa u onkologicky nemocných (<i>Petra Holečková</i>)	515
3.2.6 Kardiotoxicita anti-HER2 léčiv	472	3.8.1 Úvod	515
3.2.7 Kardiotoxicita inhibitorů signální dráhy VEGF(R)	473	3.8.2 Energetické zdroje a jejich změny u onkologických pacientů	515
3.2.8 Kardiotoxicita dalších cílených léčiv	474	3.8.3 Příčiny malnutrice u onkologického pacienta	516
3.2.9 Kardiotoxicita inhibitorů aromatáz (IA) a tamoxifen u postmenopauzálních žen	474	3.8.4 Energetický výdej onkologicky nemocného organismu	517
3.2.10 Radioterapie	474	3.8.5 Ztráta svalové hmoty (sarkopenie)	517
3.3 Nefrotoxická a urotoxická (<i>Silvie Rajnochová Bloudíčková, Jan Novotný</i>)	475	3.8.6 Kachexie (nádorová podvýživa, nádorová malnutrice)	517
3.3.1 Nefrotoxická cytostatik	475	3.8.7 Sledování stavu výživy	517
3.3.2 Nefrotoxická cílené léčby	477	3.8.8 Nutriční intervence u onkologicky nemocných	519
3.3.3 Stanovení clearance kreatininu	480	3.8.9 Farmakoterapie v nutriční péči	520
3.3.4 Vzorce pro výpočet glomerulární filtrace	480	3.9 Anémie u onkologických pacientů (<i>Jarmila Kissová</i>)	522
3.3.5 Dávkování uroprotektivních látek	480	3.9.1 Klasifikace anemií	522
3.4 Léky modifikující kostní metabolismus (<i>Jan Novotný, Pavel Vítek</i>)	482	3.9.2 Léčba anémie	523
3.4.1 Problematika kostních metastáz	482		

3.10 Léčba nežádoucích účinků inhibitorů imunitních checkpointů (<i>Jan Novotný</i>)	525	3.12 Dávkování léků ve zvláštních klinických situacích (<i>Jan Novotný</i>)	536
3.10.1 Kožní toxicita	527	3.12.1 Dávkování onkologických léčiv u obézních pacientů	536
3.10.2 Gastrointestinální toxicita	527	3.12.2 Dávkování onkologických léčiv u pacientů po amputačních výkonech	536
3.10.3 Kardiální toxicita	528		
3.10.4 Pneumotoxicita	529	Souhrn	539
3.10.5 Toxické projevy na endokrinní orgány	529	Summary	541
3.10.6 Renální toxicita	530	Seznam zkratk	543
3.10.7 Revmatologické nežádoucí účinky	531	Rejstřík	553
3.10.8 Neurotoxicita	531		
3.11 Maligní ascites (<i>Jana Selucká</i>)	532		
3.11.1 Etiopatogeneze	532		
3.11.2 Klinický obraz	533		
3.11.3 Diagnostika	533		
3.11.4 Terapie maligního ascitu	534		



Předmluva

Vážení čtenáři,

právě držíte v rukou knihu *Onkologie v klinické praxi* s podtitulem *Standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů*. Jedná se o již čtvrté, významně přepracované a doplněné vydání.

Důvodů k aktualizaci této monografie bylo opravdu mnoho. Tím nejzásadnějším byl obrovský pokrok v terapii prakticky všech nádorů. Dalším důvodem byla snaha poskytnout klinikům česky psaný zdroj odborných informací. Taková kniha na trhu dosud chyběla, a tak jsme začali usilovně pracovat na zohlednění nejnovějších trendů a postupů v textu knihy.

Další podobně zaměřené knihy na trhu cílí spíše na internisty, chirurgy apod., zatímco naše kniha cílí přímo do ordinací klinických a radičních onkologů, kteří budou mít po ruce podklady pro složitá rozhodování u konkrétních pacientů. Předpokládáme, že kniha bude i vhodným textem pro přípravu na atestaci.

K přednostem této monografie patří systematicky a do hloubky, avšak zároveň srozumitelně popsané děje, které jsou na molekulární úrovni zodpovědné za vznik a rozvoj maligních nemocí – buněčné dělení, růst, diferenciace a apoptóza, reparace DNA a kancerogeneze. To vše excelentně připravili prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D., a doc. MUDr. Ondřej Havránek, Ph.D. Náborná barevná schémata doplňující jednotlivé kapitoly umožňují vizualizovat si a pochopit složité děje, které ve fyziologických buňkách nastávají a vedou k malignitám. Další je skutečnost, že autoři důsledně ctí genetickou nomen-

klaturu: geny jsou popsané kurzívou, jejich proteinové produkty běžným písmem, geny nepředchází zbytečné „c“ před jejich symbolem, zkratka čtenář neztrácí nit a vždy ví, zda se pohybujeme v buněčném jádře nebo již jde o přepsané geny do jednotlivých produktů.

V obecné části přibyla informace o nových způsobech testování léků a nových designech klinických zkoušek a kliničtí onkologové jistě ocení seznámení se zásadami radiční onkologie. Do této sekce přibyla také ucelená kapitola o pozitronové emisní tomografii.

Druhá část obsahuje informace o širším spektru diagnóz, než tomu bylo dříve. Přibyla kapitola o mezoteliomu, nově jsme se věnovali i melanomu okulárnímu a slizničnímu.

A pokud jde o třetí část popisující podpůrnou léčbu v onkologii, zde kromě aktualizovaných informací o dříve diskutovaných tématech nově zařazujeme kapitulu o terapii maligního ascitu.

Na závěr bych rád poděkoval za celý autorský kolektiv všem sponzorům, kteří umožnili vydání této knihy, a to především Klubu mladých onkologů, který je hlavním sponzorem knihy.

A čtenářům bychom rádi popřáli, aby se kniha četla lehce a aby usnadnila vaši práci či přípravu na odbornou zkoušku.

Listopad, 2024,

doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D., prim. MUDr. Pavel Vítek, Ph.D., a prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

AMGEN

Děkujeme Klubu mladých onkologů, z.s.,
za podporu vydání knihy.



1 Preklinická část

1.1 Základní charakteristiky nádorových onemocnění

Zdeněk Kleibl

Nejvýznačnější charakteristikou maligních nádorů je jejich nekontrolovatelný růst nerespektující výstavbový plán organismu. Tento výstavbový plán začíná u jednotlivých buněk sdružujících se do funkčních uskupení, ze kterých se skládají tkáně tvořící orgány uspořádané do orgánových soustav synchronizovaně pracujících v rámci organismu. Hierarchizované struktury výstavbového plánu organismu odpovídá i jeho řízení. Zatímco regulaci orgánů a jejich soustav ovládají distančně působící neurohumorální systémy, regulace jednotlivých buněk je realizována především pomocí lokálních signálů. Správnou funkci buněčných komponent napříč celým výstavbovým plánem organismu trvale dozoruje imunitní systém.

Jednotlivé buňky našeho organismu podléhají cyklické obnově, která zahrnuje nahrazení poškozených či starých (senescentních) buněk buňkami novými.

Buňky obnovujících se kompartmentů solidních tkání vznikají v naprosté většině dělením (mitózou) okolních plně maturovaných buněk. Podnětem tohoto dělení je promitotická stimulace zahrnující integraci lokálních, distančních a intracelulárních signálů vyhodnocujících připravenost dělicí se mateřské buňky k zahájení buněčného cyklu (tab. 1.1).

Počet buněčných dělení (replikační potenciál) je u normálních maturovaných buněk tkání omezen na několik desítek mitóz (tzv. **Hayflickův limit**). Hlavním omezením počtu mitóz je zkracování koncových částí chromozomů – **telomer**, ke kterému dojde při každém buněčném dělení v důsledku nemožnosti syntetizovat terminální úseky opožďujícího se vlákna dvoušroubovice DNA při semikonzervativním procesu replikace. Telomery jsou tvořeny opakující se oligonukleotidovou sekvencí (TTAGGG)_n, na kterou se váže komplex proteinů ochraňující konce chromozomů (tzv. shelterinový komplex).¹⁾ Při dosažení kriticky nízké hodnoty délky telomer v buňce dochází k ireverzibilní zástavě buněčného dělení (replikační senescence), která nakonec vede ke smrti stárnoucí buňky procesem apoptózy (viz kap. 1.4 Změny v nádorovém mikroprostředí).

Tab. 1.1 Signály ovlivňující mitogenní signalizaci v buňce

Lokální signály	růstové faktory cytokiny adhezivní molekuly
Distanční signály	hormony
Intracelulární signalizace	integrita genomové DNA délka telomer neporušenost mitochondrií energetický (ATP) a substrátový (dNTPs) dostatek

ATP – adenosintrifosfát; dNTPs – 2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty

K obnově buněčných populací především u rychle se dělících a relativně krátkodobě přežívajících buněk některých tkání (například epitelii gastrointestinálního traktu či krevních buněk) slouží progenitorové buňky vznikající z buněk kmenových. **Kmenové buňky** jsou fenotypově nezralé, nediferencované buněčné elementy mající charakter embryonálních buněk. Jejich charakteristickou vlastností je aktivní exprese genu *TERT* kódujícího **telomerázu** (RNA-dependentní DNA-polymerázu, reverzní transkriptázu, umožňující prodlužování koncových oblastí telomer), ke které v diferencovaných buňkách tkání prakticky nedochází. Smyslem kmenových buněk je doplňování progenitorových buněk, které vznikají asymetrickým dělením buněk kmenových. Při něm jedna z dceřiných buněk setrvává ve stavu kmenové buňky, zatímco druhá dceřiná buňka zahajuje přeměnu do podoby progenitoru. **Progenitorové buňky** se vyznačují vysokou mitotickou aktivitou. Jejich úkolem je nahrazování buněk tkání, které se vlivem dosažení Hayflickova limitu přestaly dělit. Výsledkem hierarchického uspořádání (kmenové buňky → progenitorové buňky → zralé buňky tkání) je **udržování tkáňové homeostázy** – dynamické rovnováhy zodpovědné za obnovu (zahrnující především mitogenezi, senescenci a apoptózu) a správnou funkci (maturaci a odpověď na regulační podněty) buněk příslušné tkáně v dlouhém časovém horizontu života člověka.

Vznik maligního nádorového onemocnění je specifickou poruchou tkáňové homeostázy počínající na úrovni buněk maligně transformované tkáně, které jsou v důsledku změny svých fenotypových vlastností, invazivního růstu a selhání kontrolních imunitních mechanismů schopny diseminovat cestou distančně se šířících metastáz. Naprostá většina zhoubných nádorových onemocnění bez léčby progreduje do systémového onemocnění vedoucího ke smrti.

Nejrozšířenější a v současnosti obecně přijímanou představou příčiny vzniku a rozvoje nádorových onemocnění je teorie **akumulace somatických mutací** způsobujících přeměnu normálních buněk tkání na buňky nádorové. Podle této koncepce vzniká nádorová trans-

formace na základě postupné akumulace aberací postihujících genomovou DNA (*viz kap. 1.2.1 Typy a příčiny poškození genomové DNA*) v nádorových kmenových buňkách, které díky buněčnému dělení propagují somatické (vzniklé v průběhu života) genetické změny do svých dceřiných buněk. Buňky s novými aberacemi jsou základem odvozených nádorových subpopulací s expanzivním růstem (**klonální expanze**). Třebaže základem primárního nádorového (a následně i metastatického) ložiska je populace maligně transformovaných buněk tkání (s naprostou převahou buněk epitelových tkání, ze kterých vznikají karcinomy), vývoj nádorového ložiska zahrnuje komplexní interakce mezi buňkami nádorovými, imunokompetentními, stromálními či vaskulárními.

Bez ohledu na to, zda se jedná o poškození rozsáhlé části genomu, či mutace na úrovni jediného deoxyribonukleotidu genomové DNA, pro maligní transformaci a další vývoj nádorového onemocnění je rozhodující kvalitativní a kvantitativní poškození dvou skupin genů. První skupinou jsou **protoonkogeny**, kódující bílkoviny pozitivně ovlivňující růst, přežívání či migraci nádorových buněk, a jejich protipólem jsou **tumor supresorové geny**.*

Pro změnu protoonkogenů (nemutovaných, přirozeně se vyskytujících genů pro onkogeny) na onkogeny stačí aktivační (*gain-of-function*) mutace pouze jedné alely, proto o nich hovoříme jako o dominantních genech. Vrozené patogenní mutace v protoonkogenech způsobující dědičná nádorová onemocnění se prakticky nevyskytují, protože aktivovaný onkogen by byl v takových případech přítomen ve všech buňkách od počátku života nosiče mutace (hereditární mutace genů pro receptorové tyrosinkinázy *RET*, *MET* nebo *KIT* jsou specifické výjimky z pravidla). Oproti tomu, pro inaktivaci tumor supresorových genů je nezbytné inaktivovat obě alely (tzv. **two-hit** neboli **Knudsonova hypotéza**) a mutace tumor supresorových genů tak označujeme jako recesivní inaktivace. K inaktivaci tumor supresorových genů v nádorových buňkách dochází řadou různých mechanismů způsobujících ztrátu funkce jejich genových produktů (*loss-of-function*) mutace²⁾. Alterace

* Termín **onkogen** lze v obecném kontextu použít pro libovolný gen, jehož mutovaný či zvýšeně exprimovaný proteinový produkt (ale i miRNA) se pozitivně podílí na vzniku nebo rozvoji nádoru (včetně metastazování, angiogeneze apod.). Analogicky, označení **tumor supresor** se užívá pro jakékoliv geny, jejichž ztráta či funkční inaktivace způsobuje poruchy přispívající ke vzniku či rozvoji nádorového onemocnění. Formálně správně by termín **onkogen** měl být vyhrazen pro mutovanou formu genu, zatímco termín **protoonkogen** pro „divokou“ (*wild type*, WT) formu genu bez mutace. V současném písemnictví se však termínem onkogen označují promiskuitně obě formy s doplněním, o které formě mluvíme v podobě adjektiva – *wild type* (WT) nebo mutovaná forma genu.

genů pro tumor supresory zahrnují nejen bodové či malé posunové mutace, ale také typicky výpadky alel (ztráty genových oblastí – lokusů – ve kterých se tumor supresorové geny vyskytují), které lze při analýze DNA izolované ze vzorků nádorů zachytit v podobě tzv. LOH (*loss of heterozygosity*; obr. 1.4A).*

Funkční inaktivaci tumor supresorových genů dále způsobují i **epigenetické změny**, jakými jsou např. hypermetylace jejich promotorů (viz kap. 1.2.3 *Epigenetické změny*), nebo funkční inaktivace proteinových produktů tumor supresorových genů, jako je například jejich cílená degradace pomocí ubiquitinylace (označení cílového proteinu navázáním polypeptidu ubiquitinu) a následná degradace v proteazomu (multiproteinovém komplexu sloužícím pro hydrolytické štěpení nepotřebných nebo chybně sestavených intracelulárních bílkovin). Funkční inaktivace je častým mechanismem poruchy funkce tumor supresorových genů způsobeným onkogenními viry (viz kap. 1.2.2, tab. 1.4).

Vývoj nádorového onemocnění může být významně urychlen existencí **dědičných mutací v nádorových predispozičních genech**, které jsou přenášeny v postižených rodinách z generace na generaci zárodečnými buňkami, nebo vzácněji v germinálních buňkách vznikají *de novo*. Dědičné patogenní mutace v nádorových predispozičních genech dávají vzniknout **dědičným nádorovým syndromům**.³⁾ Inaktivace obou alel tumor supresorových genů je nezbytnou podmínkou pro vznik nádorového onemocnění a vysvětluje:

- Proč je naprostá většina dědičných nádorových syndromů způsobena zárodečnými mutacemi právě v tumor supresorových genech?
 - Protože samotné nosičství jedné patogenní alely není spojeno s žádným fenotypovým projevem a nádorové onemocnění se vyvine teprve po získání somatické či funkční inaktivace druhé alely genu v průběhu života nosiče patogenní zárodečné mutace.
- Proč nosičství (přítomnost vrozené patogenní mutace jedné alely) v nádorovém predispozičním genu zvyšuje riziko onemocnění?

- Protože inaktivace druhé alely příslušného tumor supresorového genu u nosičů mutací je pravděpodobněji událost než mutace obou nezávislých alel u osoby bez vrozené mutace.

Do skupiny tumor supresorových genů jednoznačně patří i **DNA reparační geny** zodpovědné za syntézu bílkovin podílejících se na procesech oprav DNA (viz kap. 1.2.2). Poruchy DNA reparačních mechanismů umožňují postižené buňce tolerovat vznik mutací, které by za normálních okolností vedly k zástavě buněčného cyklu, indukci apoptózy či aktivaci senescence (úplné ztráty schopnosti se dělit). Tolerované mutace DNA způsobují maligní transformaci a dále se podílejí na vzniku heterogenních nádorových klonů.

Nádorové ložisko není pouhým konvolutem divoce rostoucích nádorových buněk, který se nachází v jinak fyziologickém mikroprostředí postižené tkáně. Ukazuje se, že vlivem nádorové transformace se mikroprostředí dynamicky mění a aktivním způsobem se podílí na rozvoji nádorového onemocnění, ve kterém jsou nádorová ložiska tvořena komplexním ekosystémem nádorového mikroprostředí složeného jak z buněk nádorových, tak z doprovodných buněk stromatu, endotelu, imunitních buněk a dalších buněčných populací.⁵⁾

Poznatky, které jsme zejména v posledním čtvrtstoletí získali o charakteru, molekulární podstatě, mechanismu vzniku a dynamice růstu nádorových onemocnění, umožnily Hanahanovi a Weinbergovi (re)definovat základní molekulární „charakteristiky“ („*hallmarks*“) nádorových onemocnění (tab. 1.2).⁴⁾

Identifikace nádorových „charakteristik“ se stala základem koncepčně nového přístupu k terapii nádorového onemocnění v podobě cílené léčby. Na rozdíl od konvenční léčby, která zohledňuje především obecné znaky nádorů (např. jejich vysokou potřebu syntézy DNA), je pro úspěšnou aplikaci cílené léčby nezbytné charakterizovat nejen přítomnost jejího molekulárního cíle u konkrétního onkologického pacienta, ale rovněž funkční stav cílené struktury v růstu konkrétního nádoru v daném místě a čase. Pro dosažení optimálního

* Detekce LOH se provádí na základě vyšetření obvykle délkového polymorfismu mikrosatelitových markerů (obr. 1.4A), které jsou v chromozomu lokalizovány v oblasti přiléhající k vyšetřovanému tumor supresorovému genu (případně leží uvnitř genu, např. v nekódujících oblastech – intronech). Pokud je mikrosatelitový marker u vyšetřovaného pacienta informativní, obsahuje při vyšetření nenádorové DNA dvě alely o různých délkách repetice. V případě LOH zachytíme vyšetřením DNA v nádorových buňkách alelu pouze jednu, protože druhá alela byla odstraněna delecí. Nádorové buňky „ztratily heterozygotitu“ a staly se somatickými „mutantními homozygoty“. V porovnání s obrázkem 1.4A nastává tedy opačná situace než u mikrosatelitové instability. Při LOH se počet vrcholů snižuje (v obrázku 1.4 by nám tak v porovnání s normální tkání „zmizel“ jeden z vrcholů n_1 nebo n_2), protože dochází ke ztrátě jedné z alel (*loss of heterozygosity*).

Tab. 1.2 Charakteristické projevy nádorových onemocnění označované jako „hallmarks of cancer“

Charakteristické známky – „hallmarks“ – nádorových onemocnění, příklady poruch	Specifická protinádorová léčba (ve fázi I a II)
Poruchy genomové integrity a vznik mutací souvisí s poruchami genů kódujících DNA reparační proteiny, které zahrnují senzory rozpoznávající poškození DNA (PARP1), proteiny katalyzující opravy DNA a proteiny inaktivující nebo eliminující mutagenní látky. K tumorigenezi přispívají i epigenetické faktory, jako jsou metylace promotorů tumor supresorů nebo chromatinové modifikace.	inhibitory PARP1, poruchy HDAC (inhibitory CHK1/ATR, DNMT)
Mitotická hyperstimulace může postihovat všechny etáže mitogenní signalizace od vlastních signálních molekul – receptorových tyrosinkináz (RTK), jejich receptorů (např. genu <i>ERBB2</i>), signálních přenašečů (např. KRAS) či transdukčních kináz (např. BRAF).	inhibitory RTK, BRAF, MEK, JAK
Poruchy regulace buněčného dělení zahrnují především aberantně zvýšenou aktivitu komplexů cyklinů s cyklin-dependentními kinázami (CDKs) a inhibici jejich negativních regulátorů (např. P21WAF1/CIP1) aktivovaných v případě defektů buněčného cyklu. Velmi často postihují genetické alterace i geny kódující regulační proteiny klíčových kontrolních bodů buněčného cyklu (např. P53, RB).	CDK4/6 inhibitory
Imortalizace a poruchy senescence způsobují prodloužení generačního času nádorových buněk a růst nádorového ložiska. Jsou provázeny zvýšenou aktivitou telomerázy a poruchami dalších regulačních cest zabráňujících dělení přestárých buněk.	inhibitory TERT
Poruchy apoptózy způsobují rezistenci na její aktivaci a zahrnují řadu jejich funkčních úrovní a aktivačních drah (např. poruchy genů pro aktivační membránové receptory, zvýšenou expresi antiapoptotických regulátorů permeability zevní mitochondriální membrány [BCL2]). K poruchám apoptózy přispívají i mutace <i>P53</i> genu, které působí snížení exprese proapoptoticky působících genů (např. <i>BAX</i> , <i>PUMA</i> , <i>NOXA</i>) indukovaných transkripčním faktorem P53.	BH3-mimetika, SMAC mimetika / IAP inhibitory, MDM2 inhibitory
Aktivace migrace a metastatického potenciálu se u karcinomů projevuje jako aberantní aktivace komplexního vývojového programu nazývaného epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), které se účastní poruchy genů kódujících adhezivní proteiny a jejich regulátory (např. mutace <i>CDH1</i> kódující E-kadherin nebo zvýšená exprese jeho transkripčních represorů ZEB1/2 nebo KLF8).	inhibitory HGF/MET (inhibitory HSP90)
Zvýšená angiogeneze umožňuje akcelеровaný růst nádorového ložiska vyžadujícího excesivní přísun živin a kyslíku, který může zajistit pouze dostatečné prokrvení zajištěné cévním řečištěm. Novotvorba cév je stimulována především růstovým faktorem VEGF zvýšeně produkovaným v nádorových i stromálních buňkách a negativní regulací inhibitorů angiogeneze (např. TSP – trombospondin).	inhibitory VEGFR
Rezistence na imunitní regulaci a pronádorová zánětlivá reakce je důležitou součástí tumorigeneze zabráňující efektivní eliminaci nádorových buněk imunitními buňkami, na které se podílejí i buňky nádorového mikroprostředí. Zahrnuje změny architektury nově tvořených cév znemožňujících efektivní průnik výkonným imunokompetentním buňkám (NK buňky) nebo produkci signálních molekul s imunosupresivními účinky (chemokin CCL21). Zánětlivá reakce v oblasti zánětlivého ložiska nekrotizující nádorové tkáň často spíše katalyzuje invazivitu nádorového procesu.	anti-CTLA-4 a anti-PD-1 protilátky (COX1/2 inhibitory)
Poruchy energetického metabolismu nádorových buněk se zvýšenou utilizací glukózy cestou anaerobní glykolýzy jsou jednou z nejdéle známých molekulárních charakteristik maligních nádorů. Příčiny přesunu produkce ATP v nádorových buňkách směrem k anaerobní fosforylaci zahrnují změny signálních drah, ve kterých účinkuje řada proteinů (PI3K, HIF1, P53, MYC a AMPK1/STK11). Vyčerpání energetických zdrojů organismu je jednou ze zásadních příčin vzniku nádorové kachexie a v konečném důsledku úmrtí na nádorová onemocnění.	inhibitory aerobní glykolýzy

terapeutického výsledku tedy nevystačíme pouze s informací, zda je cílená molekula (např. membránová receptorová kináza, např. EGFR) exprimována nádorovými buňkami u pacienta léčeného cetuximabem, ale potřebujeme vědět, zda tato molekula není funkčně

poškozena aktivační mutací způsobující, že její inhibice protilátkou cílenou proti extracelulární doméně je zbytečná podobně jako v přítomnosti aktivačních mutací následných přenašečů signálu (RAS) či intracelulárních kináz (BRAF) přenášejících mitotický signál

do buněčného jádra. Nadto, tato informace má smysl pro vyšetřovaný nádor, ale její směrodatnost při rekurenci onemocnění, byť u stejného pacienta, je sporná. Výsledky cílené léčby omezuje významná heterogenita nádorových onemocnění a jejich dynamické změny, které mohou způsobit ztrátu funkce cílené struktury (v důsledku zvýšené frekvence vzniku somatických mutací DNA vyplývajících z poruch DNA reparačních mechanismů v maligně transformovaných buňkách), a tím zapříčiňují vznik rezistence. Třebaže cílená léčba není dokonalým všelékem, jedná se o nadějný koncept, který v podobě agnostického přístupu proměňuje léčbu nádorových onemocnění.⁵⁾

Smyslem preklinické části je popsat klíčové molekulární charakteristiky nádorového onemocnění v kontextu jeho vzniku, rozvoje a interakce s nádorovým mikroprostředím. Tyto informace považujeme za důležitý základ racionální aplikace cílené léčby. Důraz klademe především na ty charakteristiky, které je možné využít jako prognostické či prediktivní faktory.

Na počátku uvedeme charakteristiku genetických defektů podílejících se na vzniku nádorových onemocnění a stručně představíme přístupy k jejich analýze pomocí sekvenování nové generace, které sehrává důležitou roli pro definování cílů kauzální léčby. Dále se budeme zabývat dalšími molekulárními charakteristikami buněk nádorů (poruchy promitotické signalizace a řízení buněčného cyklu, defekty apoptózy, změny v nádorovém metabolismu) a změnami v interakci mezi nádorovými buňkami a nádorovým mikroprostředím (angiogeneze, metastazování a interakce s imunitním systémem).

1.2 Poruchy genomu způsobující nádorová onemocnění

Zdeněk Kleibl

Příčinou vzniku nádorových onemocnění je **poškození genomové DNA**. K poruchám DNA dochází z řady endogenních i exogenních příčin. Hlavním zdrojem endogenních **genotoxických poškození** jsou volné kyslíkové radikály, spontánní poruchy struktury DNA a poruchy replikačních komplexů při buněčném dělení. Poškození DNA však vzniká i působením řady exogenních fyzikálních, chemických či biologických faktorů. Na druhé straně, cílené poškození genomové DNA v mitoticky vy-

soce aktivních nádorových buňkách je hlavním terapeutickým účinkem různých modalit protinádorové léčby.

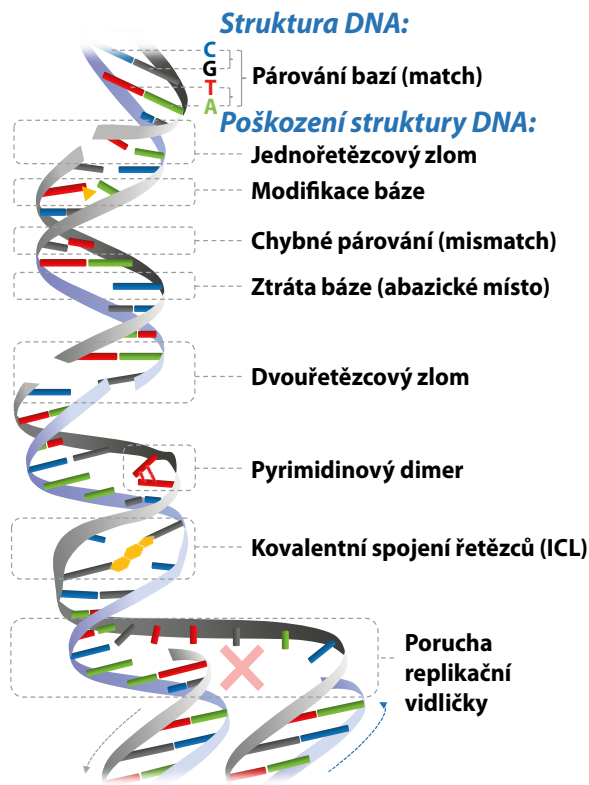
1.2.1 Typy a příčiny poškození genomové DNA

I bez exogenních genotoxických vlivů však vzniká v každé buňce denně přibližně 50 000 poškození DNA, tj. přibližně 1 alterace na 60 kilobází (~ 17 alterací na 1 Mbp) genomové DNA.⁶⁾ Poškození DNA mohou postihnout strukturu jednotlivých dusíkatých bází, jejich kovalentní spojení s molekulou deoxyribóza-fosfátu v nukleotidu nebo fosfodiesterové vazby spojující nukleotidy do polynukleotidového řetězce DNA (obr. 1.1).

Nejčastějšími poruchami DNA jsou defekty způsobené odštěpením dusíkaté báze. Štěpením N-glykosidové vazby připojující dusíkatou bázi k molekule deoxyribóza-fosfátu vznikají **abazická místa**, která jsou nejčastějším poškozením struktury DNA.

Častá jsou rovněž přerušení jednoho z řetězců pentóza-fosfátové kostry DNA (**jednořetězcové zlomy**; stovky denně) vznikající působením volných kyslíkových radikálů, při defektech v některých DNA reparačních pochodech nebo při poruše funkce DNA topoizomérázy I (TOP1). Z hlediska závažnosti patří mezi nejvýznamnější poškození DNA s významným kancerogenním potenciálem úplné přerušení obou vláken DNA (**dvouřetězcové zlomy**; jednotky denně) v mitoticky aktivních buňkách. Neopravené dvouřetězcové zlomy DNA mohou při buněčném dělení způsobit významné numerické změny velkých úseků chromozomů za vzniku jejich duplikací či delecí nebo mohou být příčinou chromozomálních přestaveb (translokací, inverzí), které se významně podílejí na genomové nestabilitě. Dvouřetězcové zlomy vznikají působením ionizujícího záření, ale mohou se vyvinout i v důsledku **poruch replikační vidličky** (komplexní dynamické struktury obsahující rozvolněnou strukturu vláken DNA, která slouží jako templát DNA polymeráze při replikaci DNA v mitoticky aktivních buňkách) či při nedokonalých opravách dalších typů poškození DNA.

Dominantními **fyzikálními faktory** s genotoxickými účinky jsou různé druhy **ionizujícího záření**, jehož energie je dostatečná k uvolnění elektronů z atomů a molekul ozařené DNA. Vznikající vysoce reaktivní ionty interagují s okolními molekulami a změnou jejich kovalentních vazeb je poškozují. Lidský organismus je trvale vystaven chronické expozici ionizujícího záření přírodního původu (např. radon) či radioaktivního záření vznikajícího



v důsledku lidské činnosti (nukleární zbraně, havárie jaderných elektráren) či kosmického záření. Buňky organismu jsou na účinky ionizujícího záření citlivé různě. Nejvíce senzitivní jsou dělicí se buňky mitoticky vysoce aktivních populací, zatímco buňky terminálně diferencovaných tkání vykazují obecně k účinkům ionizujícího záření vyšší odolnost. Tento poznatek logicky vedl k využití ionizujícího záření v podobě **radioterapie** (viz kap. 1.8 Úvod k radioterapii). Působení záření na cílové struktury nádoru při radioterapii je komplexní. Přímé genotoxické účinky způsobují poškození molekuly DNA za vzniku jedno- či dvouřetězcových zlomů. Sekundární (nepřímé) působení ionizujícího záření vzniká v důsledku tvorby volných kyslíkových radikálů (ROS). Jejich působení na molekuly DNA může způsobit přerušení fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy za vzniku jednořetězcových zlomů. Přerušení N-glykosidové vazby vede k odstěpení dusíkaté báze a vzniku abazického místa. ROS však mohou atakovat i samotné báze za vzniku jejich modifikovaných analog (obr. 1.2) či DNA aduktů (sloučenin vznikajících kovalentním připojením molekuly na strukturu báze v deoxynukleotidu). Např. navázáním malondialdehydu (M), reaktivního elektrofilního

Obr. 1.1 Poruchy struktury genomové DNA. Dvoušroubovici DNA (za přírodních podmínek pravotočivá dvoušroubovice s výrazným velkým a malým žlábkem) tvoří dva řetězce polynukleotidů složených z deoxynukleotidů spojených fosfodiesterovou (–O–P–O–) kovalentní vazbou. Zatímco kostru dvoušroubovice tvoří kovalentně spojené molekuly deoxyribózaforosfátu, dusíkaté báze [cytosin (C), guanin (G), thymin (T) a adenin (A)] spojují oba antiparalelní řetězce vodíkovými můstky, které se utvářejí na základě Watsonova–Crickova pravidla o párování bází (A–T; G–C).

Jednořetězcové zlomy vznikají přerušením kovalentních vazeb jednoho z řetězců DNA.

Modifikace bází způsobují poruchy v párování podobně jako zařazení chybné báze při replikaci DNA (**mismatch**).

Nejčastější poruchou je vznik **abazických míst**. Ztrátou purinových bází (A nebo G) vznikají apurinová místa, ztrátou pyrimidinových bází (C nebo T) dochází ke vzniku apyrimidinových míst.

Dvouřetězcové zlomy jsou závažnými poruchami struktury DNA s přerušením deoxyribózaforosfátové kostry obou řetězců.

Při vzniku kovalentní vazby mezi sousedními bázemi jednoho řetězce DNA (např. mezi sousedními T za **vzniku dimeru thyminů**) dochází k poškození struktury DNA dvoušroubovice.

Kovalentní spojení obou řetězců (ICL, *interstrand crosslink*) způsobuje významné změny struktury DNA.

Závažné důsledky má i **porucha replikační vidličky**, ke které může dojít z řady příčin při replikaci DNA, kdy například replikační aparát narazí na místo výše uvedených poruch DNA.

činitelů vznikajícího v důsledku lipoperoxidace polyneenasycených mastných kyselin, na deoxyguanosin vzniká N1-metyl-deoxyguanosin (M₁dG), adukt s výrazně mutagenními a kancerogenními účinky. Kromě poškození DNA analogicky působí ionizující záření i na intracelulární proteiny. Vznikající ROS vykazují vysokou afinitu k nenasyceným mastným kyselinám obsaženým ve fosfolipidech membránových struktur buňky. Následná lipoperoxidace přispívá k poškození buněk cílové tkáně vedoucímu až k jejich rozpadu, což je cíl cytotoxického působení radioterapie.

Po nástupu inhibitorů imunitních checkpointů se do popředí zájmu dostávají i důsledky působení radioterapie a její širší vliv na modulaci protinádorové imunitní odpovědi. Rozpad nádorových buněk v ozařovaném ložisku nádorové tkáně způsobuje odhalení intracelulárních neoantigenů, které jsou vhodným cílem protinádorové buněčné imunity a změny v lokální i systémové imunitní odpovědi. Značné renesance se v poslední době dostalo výzkumu tzv. abскопálního (mimoložiskového) účinku radioterapie, kdy ozáření jednoho ložiska nádoru způsobí prostřednictvím protinádorové imunitní reakce regresi ostatních ložisek nádoru. Z výsledků řady prací

však vyplývá, že podobný efekt je spíše výjimkou než pravidlem, avšak teprve výsledky probíhajících studií s cíleným ozáření více či všech ložisek (u oligometastického postižení) umožní vyhodnotit jeho možný přínos.⁷⁾

Nezanedbatelným zdrojem poškození struktury DNA je **UV záření**. Neproniká do hlubších tkáňových struktur, a proto poškození DNA postihuje především buňky epidermis. UV záření způsobuje fotochemickou reakci, v jejímž důsledku vznikají kovalentní vazby mezi pyrimidinovými jádry tyminů sousedících v jednom řetězci. Vzniklý cyklobutanový tyminový dimer deformuje strukturu DNA (obr. 1.1) a má významnou kancerogenní aktivitu a výrazný podíl na vzniku kožních nádorů.

Z dalších fyzikálních faktorů je třeba připomenout silné kancerogenní účinky vláknitých silikátů (azbestu). Přestože expozice azbestu prokazatelně zvyšuje riziko vzniku nádorů (především mezoteliomu pleury), mechanismus vzniku onemocnění není jasně znám.

Chemická kancerogeneze je jednou z nejdéle známých příčin vzniku nádorů. Za první vědecky podložený popis kancerogenního působení chemických látek je považována práce britského chirurga Percivala Potta, který v roce 1775 publikoval hypotézu o příčině vzniku karcinomu šourku u kominíků spočívající v dlouhodobém působení sazí v kožních záhybech skrota. Do dnešní doby bylo popsáno tisíce chemických látek přirozeného i umělého původu s prokázaným či předpokládaným kancerogenním účinkem (uceleným zdrojem informací o environmentálních kancerogenech je stránka International Agency for Research on Cancer, IARC – IARC monographs: <https://monographs.iarc.who.int/>). IARC klasifikuje kancerogeny, včetně chemických látek, do čtyř skupin. Skupina 1 zahrnuje látky s prokázaným kancerogenním působením, skupina 2 látky s pravděpodobným (2A) nebo možným (2B) kancerogenním účinkem, skupina 3 zahrnuje látky bez prokázaného kancerogenního účinku u člověka.

Chemické kancerogeny se rovněž rozdělují na základě přímého kancerogenního účinku. **Primární kancerogeny** vykazují kancerogenní účinky samy o sobě. Do této skupiny patří např. alkylační činidla nebo deriváty sulfonylmočoviny. **Sekundární kancerogeny (též pro-**

kancerogeny) získávají kancerogenní účinky po biotransformaci v organismu. Hlavním biotransformačním systémem aktivace prokancerogenů jsou enzymy z rodiny cytochromů P450. Mezi silné prokancerogeny patří nitrosaminy, aromatické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky, z přírodních látek například aflatoxin B₁. Jako **kokancerogeny** se označují látky zvyšující kancerogenní účinek kancerogenů nepřímo, například indukci biotransformačních enzymů či zvýšením jejich absorpce. Do této skupiny zahrnujeme etanol, některé steroidní hormony a jejich deriváty (např. tamoxifen zvyšující riziko vzniku karcinomu endometria). Nepřímý účinek mají rovněž tzv. **promotory**, které se podílejí na kancerogenním účinku stimulací proliferace či chronického zánětu (estery forbolu v krotonovém oleji). Většina chemických kancerogenů se nevyskytuje osamoceně, ale je součástí chemických „koktejlů“, ve kterých se vyskytují současně zástupci různých skupin kancerogenů (např. v cigareto-ovém kouři).*

Chemická kancerogeneze zahrnuje několikastupňový proces shodný s obecnou představou maligní transformace i v důsledku jiných příčin. Při reverzibilní iniciaci dochází ke vzniku mutací DNA, které jsou opravitelné DNA reparačními pochody. Mutace způsobují chemické kancerogeny, které kovalentně modifikují DNA přímo (např. za vzniku aduktů, jako je tomu u platinových derivátů), nebo mění prostorové uspořádání DNA dvoušroubovice (interkalační činidla, např. doxorubicin). Při selhání mechanismů oprav poškození DNA dochází k růstové stimulaci (promoci) latentních nádorových buněk, které po získání dalších mutací začnou progredovat a tvořit primární ložisko.

Z výše uvedeného textu je zřejmé, že podobně jako v případě ionizujícího záření i u chemických kancerogenů využíváme jejich antineoplastický terapeutický účinek díky vyšší citlivosti rychle se dělících buněčných populací na poškození DNA. Obě protinádorové modalitě se vyznačují úzkým terapeutickým oknem, které vysvětluje bohužel častý výskyt závažných nežádoucích účinků, které vyplývají z obtížně predikovatelné individuální senzitivity k účinkům radioterapie a chemoterapie. Značné riziko kancerogenního působení radioterapie a chemoterapie, ohrožující především mladší úspěšně léčené pacienty s nádorovým onemocněním vznikem

* Logickou součástí přehledu by měly být i látky s opačnými, tedy antikancerogenními účinky. Přestože mnoho potenciálních kandidátů (čistých substancí, např. resveratrol, či směsí látek, jako jsou různé druhy ovoce či léčivých čajů) bylo asociováno se sníženým výskytem nádorů, žádná z těchto substancí nemá prokazatelný přímý protinádorový účinek. Za nejlepší antikancerogenní strategii lze však jednoznačně považovat omezení expozice prokazatelným kancerogenům, jako je např. kouření, nadměrná konzumace alkoholu apod.

Tab. 1.3 Přehled lidských onkogenních virů se stručnou charakteristikou mechanismu kancerogenního působení virových proteinů a přehledem nádorových onemocnění asociovaných s chronickou infekcí

Virus Čeď (skupina)	Známé klíčové mechanismy onkogenního účinku	Asociovaná nádorová onemocnění
EBV herpesvirý (dsDNA)	Translokace t(8:14) nebo (8:22) způsobuje translokaci <i>c-MYC</i> do oblasti silně exprimovaných genů Ig řetězců. EBNA1 (<i>EBV nuclear antigen</i>) inhibice USP7 deubikvitinylujícího P53 => snížení stability P53. Indukuje EMT u nazofaryngeálního ca. Podílí se na genomové nestabilitě. EBNA3A – snižuje expresi BIM (inhibice apoptózy) a p16 ^{INK4} (ztráta negativní regulace buněčného cyklu). LMP1 aktivuje NFκB.	B buněčný (Burkittův) lymfom (endemická forma 100 % pozitivní) non-Hodgkinův lymfom (DLBCL; 5 % pozitivní v EU) Hodgkinův lymfom nazofaryngeální ca ca žaludku asociovaný s EBV
HBV hepadnavirý (dsDNA)	Integrace HBV do blízkosti <i>hTERT</i> genu. HBx inaktivuje P53, zvyšuje expresi <i>TERT</i> a ovlivňuje expresi řady proonkogenních signálních drah. Zvýšením exprese <i>HIF1a</i> , <i>VEGF</i> a angiopoetinu (<i>ANG2</i>) zvyšuje angiogenezi.	hepatocelulární ca (50 % pozitivní)
HCV flavivirý (+ssRNA)	NS5A (non-structural protein 5A) aktivuje β-katenin a PI3K signalizaci, inhibuje apoptózu. NS3 indukují produkci NO a ROS => poškození DNA a rozvoj fibrózy. NS3/4 interaguje s ATM => inhibice DNA reparace.	hepatocelulární ca non-Hodgkinův lymfom
HPV papilomavirý (dsDNA)	E6 (<i>early ORF 6</i> ; v-onkogen) destabilizuje P53 (ovlivněním jeho ubikvitinylace). E7 (v-onkogen) inhibuje RB1 (ovlivněním jeho ubikvitinylace). E5 vytváří mnohočetné protein–proteinové interakce ovlivňující expresi povrchových proteinů (MHC I), mitogenní signalizaci (EGFR) a apoptózu (porucha aktivace DISC).	ca děložního hrdla (> 90 % pozitivní; HPV16/18/45) orofaryngeální ca (10 % pozitivní; HPV16) ca anu (97 % pozitivní; HPV16/18) ca penisu (45 % pozitivní; HPV16/18/6/11) ca vulvy (40 % pozitivní; HPV16/18) ca vagíny (70 % pozitivní; HPV16/18) ca kůže u epidermodysplasie verruciformis (HPV5/8)
HTLV1 retrovirý (ssRNA)	Integrace do genomu (CD4 lymfocyty). Tax je transaktivní protein, aktivuje CREB a NFκB a je důležitý pro iniciaci onkogenní transformace. HBZ aktivuje WNT signalizaci podporující proliferaci T lymfocytů.	T-buněčná leukemie u dospělých (vyvíjí se u 2–5 % infikovaných osob 30–50 let po počáteční expozici)
KSHV (HHV8) herpesvirý (dsDNA)	LANA (<i>latency-associated nuclear antigen</i>) způsobuje inhibici P53 a RB1. vIRF1 inhibuje vazbu P53 na DNA. vIRF3 inhibuje tetramerizaci P53.	Kaposiho sarkom primary effusion lymphoma (PEL) Castlemanova lymfadenopatie
MCV polyomavirý (dsDNA)	LT (<i>Large T</i>) antigen MCV integrovaného do genomu obsahuje C-koncovou doménu aktivující odpověď na přítomnost poškození DNA a P53, což zpočátku omezuje maligní transformaci infikovaných buněk. Následně dochází ke vzniku posunových mutací v <i>LT</i> genu, které způsobí ztrátu C-koncové domény. Vznikající LTT (<i>tumor-derived large T</i>) protein obsahuje CR1, DnaJ a RB-vazebný motiv, které se podílejí na porušení buněčného cyklu infikovaných buněk. ST (<i>small T</i>) inaktivuje 4E-BP1 a inhibuje SCF ^{FBW7} , čímž zamezuje ubikvitinylaci c-MYC a cyklinu E.	ca kůže z Merkelových buněk

Ca – karcinom

sekundárních malignit, je jedním z významných impulsů pro hledání méně genotoxických možností protinádorové terapie v podobě cílené léčby. Přes veškeré limitace je však úloha chemo- a radioterapie v současné onkologii nezastupitelná.

Biologické faktory se celosvětově podílejí na vzniku až 20 % nádorových onemocnění. Mezi vyvolávající agens patří hlavně onkogenní viry. Odhaduje se, že virus Epstein-Barr (EBV), viry hepatitidy B a C (HBV/HBC), lidské papilomaviry (HPV 16 a 18), lidský T-lymfotropní virus 1 (HTLV-1), herpes virus asociovaný s Kaposiho sarkomem (KSHV, synonymum HHV-8) a lidský polyomavirus izolovaný z karcinomu Merkelových buněk (MCV) se až z 90 % podílejí na vzniku nádorových onemocnění způsobených infekčními agens. Uvedené viry způsobují vznik pestré skupiny nádorových onemocnění různými mechanismy (tab. 1.3). Jednotlivým prvkem virové kancerogeneze je integrace virových genomů obsahujících silné promotory do oblastí lidského genomu, kde se nacházejí protoonkogeny, aktivace onkogenů (virových v-onc či intracelulárních protoonkogenů c-onc) a inaktivace tumor supresorových genů nebo jejich proteinových produktů. Častým cílem jsou především proteiny P53 a RB1 (viz kap. 1.3.3 *Protein P53: společné řízení apoptózy, buněčného cyklu a senescence*).⁸⁾ Důležitým patognomickým faktorem maligní transformace způsobené onkogenními viry je indukce chronického zánětu, který modifikuje buňky mikroprostředí a imunitní odpověď v okolí infikovaných buněk a přispívá k rozvoji nádoru (tab. 1.3).

Výskyt onkogenních virů není až na výjimky (HPV) pandemický a zvýšená prevalence je vázána na některé regiony. S tím je spojen i vznik specifických a u nás velmi vzácných onemocnění (např. endemická forma Burkittova lymfomu spojená s EBV infekcí se vyskytuje v pásu 15° kolem rovníku v Africe, na Papui Nové Guineji a v severní Brazílii).

Jedinou bakterií, která je dle IARC klasifikace zařazena do kancerogenů skupiny 1, je *Helicobacter pylori*. Tato gramnegativní, mikroaerofilní bakterie se podílí na vzniku více než 75 % všech karcinomů žaludku. Kancerogenní účinky *H. pylori* na buňky žaludeční mukózy jsou komplexní a zahrnují indukci dvouřetězcových zlomů DNA, inhibici DNA reparačních mechanismů (sníženou expresi mismatch repair genů), zvýšenou expresi cytidindeaminázy (*activation-induced cytidine deaminase*, AID) i aberantní metylaci DNA.⁹⁾ Klesající incidence karcinomu žaludku je pravděpodobně spojena s postupným snižováním výskytu *H. pylori* v populaci.

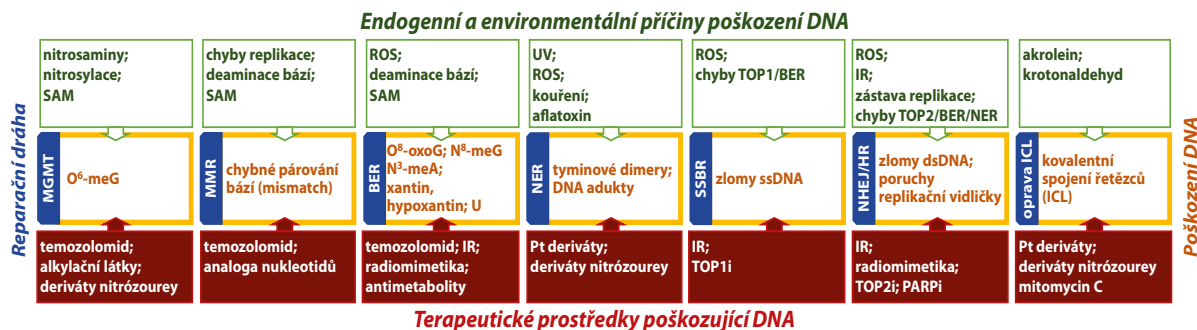
Na vzniku maligních nádorů se mohou podílet i parazité. Motolice žlučová (*Clonorchis sinensis*) a m. thajská (*Opisthorchis viverrini*) působí karcinomy žlučových cest, helminti krevnička močová (*Schistosoma haematobium*) a k. jaterní (*S. japonicum*) karcinom močového měchýře a jaterní cirhózu progredující do tumoru jater. Výskyt těchto parazitů je u nás nepravděpodobný.

Podíl fyzikálních, chemických a biologických příčin nádorových onemocnění je rozdílný v různých regionech světa, ovlivněn společenskými zvyklostmi i behaviorálními charakteristikami, genetickým pozadím a zdravotním stavem jedinců. Až na výjimky je pravděpodobné, že skutečné příčiny nádorových onemocnění mají multifaktoriální charakter, ve kterém doposud máme pouze nejasné povědomí o skutečném podílu jednotlivých příčinných komponent.

1.2.2 DNA reparační pochody

Molekula DNA je nositelkou genetické informace, charakterizující a unifikující jaderné buňky jedince po celý jeho život. Pro reparaci poškození genomové DNA se vyvinula řada mechanismů, které zprostředkovávají specifické opravy konkrétních typů poškození DNA (obr. 1.2). Poruchy konkrétních DNA reparačních pochodů se projevují specifickými typy alterací DNA, které můžeme popsat jako mutační podpisy, „*mutation signatures*“. DNA reparační pochody slouží nejen k obnově struktury DNA, ale umožňují propojení opravy DNA s dalšími intracelulárními signálními ději – zástava buněčného cyklu umožňuje dokončení opravy DNA před jeho další progresí, indukce senescence či apoptózy eliminuje buňky, které reparaci DNA nejsou schopny úspěšně dokončit. Selhání DNA reparačních mechanismů způsobuje akumulaci poškození DNA, a je tedy přímo zodpovědné za proces kancerogeneze. Na druhé straně, přítomnost poruch DNA reparačních mechanismů v některých nádorových buňkách je činí senzitivnějšími k účinkům genotoxických inzultů a tohoto stavu je možné terapeuticky využít.¹⁰⁾

Získané poruchy (somatické mutace – genetické změny nebo hypermetylace promotorů – epigenetické změny) v DNA reparačních genech jsou významnými **prognostickými, a především prediktivními faktory**. **Vrozené mutace** řady DNA reparačních genů jsou **podstatou vzniku dědičných nádorových syndromů**. Nosiči těchto mutací mají zvýšené, často velmi vysoké riziko vzniku nádorového onemocnění. Podíl dědičných forem na vzniku jednotlivých nádorových diagnóz



Obr. 1.2 Poruchy genomové DNA vznikají za normálních okolností v důsledku působení řady endogenních či environmentálních pochodů (zeleně), aktivní indukce poškození DNA je terapeutickým prostředkem protinádorové léčby (červeně). Jednotlivé noxy vyvolávají charakteristické poruchy DNA (žlutě), které jsou opravovány pomocí specifických DNA reparačních drah (modře).

BER – base-excision repair (bázová excizní reparace); **dsDNA** – dvouřetězcová DNA; **HR** – homologní rekombinace; **ICL** – interstrand crosslink; **IR** – ionizující záření; **MGMT** – O⁶-metylguanoinmetyltransferáza; **MMR** – mismatch repair; **N³-meA** – N³-methyladenosin; **N⁸-meG** – N⁸-methylguanosin; **NER** – nucleotide excision repair (nukleotidová excizní reparace); **NHEJ** – non-homologous end joining (nehomologní spojování volných konců DNA); **O⁶-meG** – O⁶-methylguanosin; **O⁸-oxoG** – O⁸-oxoguanosin; **PARPi** – PARP1 inhibitory; **Pt deriváty** – platinové deriváty; **ROS** – reactive oxygen species (volné kyslíkové radikály); **SAM** – S-adenosylmethionin; **SSBR** – single strand break repair (oprava jednořetězcových zlomů); **ssDNA** – jednořetězcová DNA; **TOP1/2** – topoizomeraza 1/2; **TOP1i** – inhibitory topoizomerazy; **UV** – ultrafialové záření

se liší. Zatímco u karcinomu ovaria přesahuje přibližně 25 % všech případů (proto jsou všechny pacientky s karcinomem ovaria indikovány ke genetickému testování), u karcinomu plic podíl dědičných forem nepřesahuje 3 %. Zvýšenou pravděpodobnost dědičného nádorového onemocnění naznačuje řada charakteristik:

- časný výskyt onemocnění v netypickém věku (např. CRC před 40. rokem věku),
- výskyt nádorových multiplicit (např. karcinom prsu a ovaria),
- častý výskyt nádorových onemocnění u příbuzných.

Při podezření na nosičství patogenní mutace v nádorových predispozičních genech by měl být pacient vždy doporučen k onkogenetické konzultaci genetikem (v každém KOC), který rozhoduje o indikaci genetického testování.

Identifikace příčinných mutací v DNA reparačních nádorových predispozičních genech u onkologických pacientů má značný klinický potenciál, který umožňuje volbu terapeutického režimu na základě defektu konkrétních reparačních drah. V následujícím textu představíme ve zkratce jednotlivé DNA reparační mechanismy s přihlédnutím k jejich prognostickému nebo prediktivnímu významu.

Přímá oprava bází DNA je v organismu vykonávána pomocí O⁶-metylguanoinmetyltransferázy **MGMT** (obr. 1.3), která odštěpuje metylový zbytek z O⁶-methylguanoinu (O⁶-meG) vznikajícího působením řady alky-

lačních látek, včetně látek používaných jako protinádorová chemoterapeutika. O⁶-meG se vyznačuje vysokou chemickou stabilitou, a tím i výrazným kancerogenním potenciálem. Bez opravy způsobuje chybné párování bází DNA (GC > AT tranzice) a v případě defektní reparace vznik dvouřetězcových zlomů. Při eliminaci metylového zbytku z O⁶-meG dochází k ireverzibilní inaktivaci MGMT, takže jedna molekula MGMT dokáže odstranit pouze jeden metyl. Schopnost eliminace O⁶-meG tak záleží na míře genové exprese MGMT v buňce. MGMT je všeobecně exprimovaným proteinem. Expres MGMT je zvýšená v některých nádorech, což zvyšuje jejich schopnost reparovat poškození DNA způsobená alkylačními chemoterapeutiky, a tím navozovat rezistenci na jejich působení. Naopak, nízká exprese MGMT (nejčastěji zapříčiněná hypermetylací promotoru *MGMT* genu; obr. 1.7) může účinnost alkylačních látek zvyšovat.

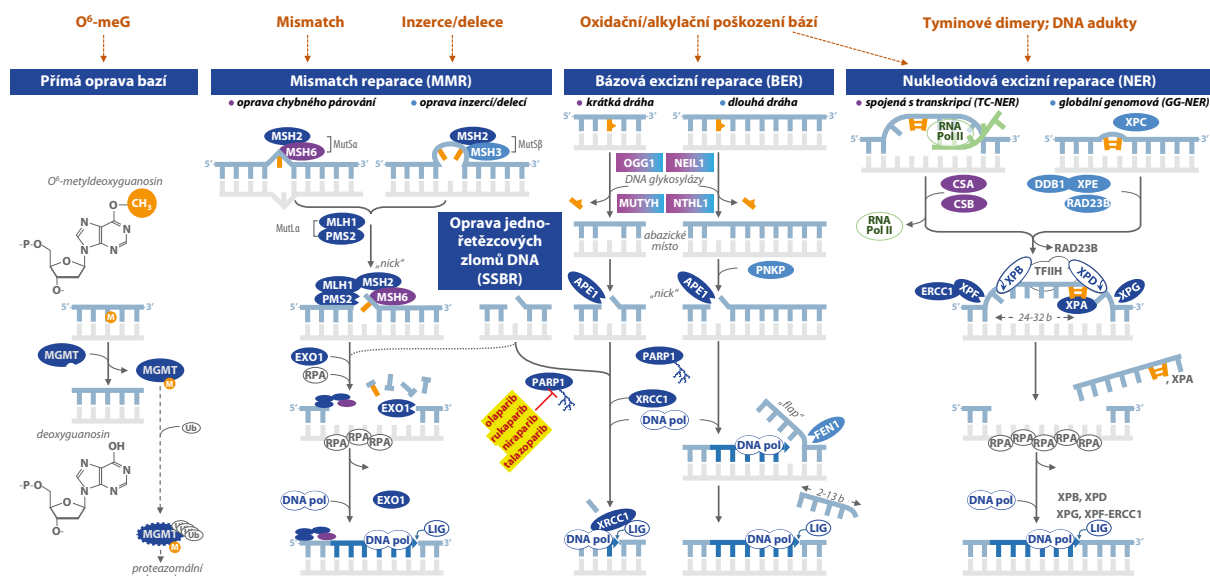
V případě nádorů CNS (tab. 1.4) má hypermetylace promotoru *MGMT* genu významný prognostický dopad u pacientů s anaplastickým gliomem a glioblastomem.¹¹⁾ Snížení aktivity MGMT v nádorové tkáni může být důležitým nástrojem pro zvýšení citlivosti nádorů na účinky alkylační chemoterapie.¹²⁾

Význam dalších enzymů, které slouží pro přímou opravu kovalentně modifikovaných bází (ALKBH1–8, které reparují např. 1-methyladenosin nebo 3-methylcytosin), je v patogenezi nádorových onemocnění nejasný.

Mismatch repair (MMR) systém slouží pro opravu chybně zařazených nukleotidů (mismatch) či krátkých inzercí/delecí při replikaci DNA (obr. 1.3). Přestože

Tab. 1.4 Frekvence hypermetylace (HM) promotoru genu *MGMT* u nemocných s gliomy

Typ	pilocytický astrocytom	pleomorfni xanto-astrocytom	difúzní astrocytom	oligodendro-gliom/oligo-astrocytom	anaplastický astrocytom	anaplastický oligo-dendroglíom/oligoastrocytom	glioblastom
MGMT HM	< 10 %	10–20 %	40–50 %	60–80 %	50 %	70 %	35 %



Obr. 1.3 Přehled DNA reparačních drah pro opravu modifikací DNA bází a nukleotidů. Přímá oprava slouží pro regeneraci alkylací postižených guanosinových bází v DNA pomocí sebevražedného enzymu MGMT. MMR slouží pro reparaci chybně zařazených či nadbytečných nukleotidů v rámci replikace DNA. Aktivita BER a NER odstraňuje kovalentní modifikace bází v DNA, v čemž se částečně překrývají, ale způsob průběhu reparační je u obou drah odlišný. BER reparuje poškození bází nezpůsobující významné změny tvaru dvoušroubovice a charakterizuje jej odštěpení modifikované dusíkaté báze za vzniku apurinového/apyrimidinového místa. NER je schopna odstranit poškození bází způsobující významné změny struktury DNA (tyminové dimery, DNA adukty), k čemuž využívá enzymového aparátu, který dokáže tyto alterace odstranit s částí postiženého řetězce DNA. Intermediátem obou drah (dominantně BER) je vznik jednořetězcového zlomu DNA, který se tak reparuje identicky.

V rámci **přímé opravy** je O^6 -meG rozpoznáván MGMT, který přenáší metylový (M) zbytek z O^6 guanosinu na akceptorový zbytek Cys145 (MGMT je transferázou a zároveň akceptorem M skupiny), čímž dochází k ireverzibilní inhibici MGMT, který je následně ubiquitinylován (Ub) a degradován v proteasomu.

Opravy chybného párování bází a krátkých inzercí/deleci při replikaci DNA pomocí **mismatch repair (MMR) systému** se odlišují v úvodní části reparační. Poruchy párování jsou rozpoznávány MutSa (složeným z proteinů MSH2 a MSH6), opravu inzercí/deleci zahajuje heterodimer MutSβ (z MSH2 a MSH3). MutS komplexy asociují s heterodimerem MutLα (tvořený proteiny MLH1 a PMS2). PMS2 endonukleáza přeruší řetězec DNA na nově syntetizovaném vlákně. (MMR je stranově specifický – k opravě dochází na nově vznikajícím vlákně DNA na základě vyhodnocení metylace templátového vlákna DNA.) Přerušení jednoho řetězce DNA („nick“) je rozpoznáno exonukleázou EXO1 odstraňující část řetězce DNA s mutací. Výsledný jednořetězcový úsek dočasně chráněný RPA proteiny je dosyntetizován podle templátového vlákna DNA polymerázou (δ nebo ε). Posledním krokem je zacelení řetězce DNA pomocí DNA ligázy (LIG1).

V prvním kroku **bázové excizní reparační (BER)** je poškozená báze v DNA vyštěpena glykosylázami za vzniku **abazického (apurinového/apyrimidinového, AP) místa**. Jednotlivé glykosylázy (OGG1, NEIL, MUTYH, NTHL1 a další) rozpoznávají určité typy poškození bází DNA. V abazickém místě je řetězec DNA otevřen AP endonukleázou (APE1). Při **reparaci krátkou dráhou (short patch)** je 5'-deoxyriboza-5-fosfát AP místa odstraněn účinkem DNA-polymerázy (POLβ), která zároveň následně naváže komplementární nukleotid na uvolněné místo. Finálním krokem je ligace řetězce DNA pomocí DNA ligázy (LIG3). Krátkou dráhu stimuluje přítomnost proteinu XRCC1, který sice nemá vlastní enzymovou aktivitu, ale vytváří strukturální oporu komplexu reparačních proteinů BER. **Dlouhá dráha (long patch)** je alternativním pochodem BER, který zahrnuje úpravu přerušovaných konců

DNA pomocí **PNKP**. Do místa přerušení nasedá DNA polymeráza s procesivní podjednotkou PCNA, jejíž přítomnost stimuluje dlouhou dráhu BER. DNA polymeráza (POL δ / ϵ – POLD/POLE) následně syntetizuje komplementární řetězec o délce 2–13 bází. Odstávající původní vláknko DNA („flap“) s AP místem je odštěpeno endonukleázou **FEN1** a nově syntetizovaný řetězec je s původním vláknem spojen DNA ligázou (LIG1). S jednořetězcovým přerušením DNA („nick“), které vzniká rovněž jako jednořetězcový zlom DNA, asociuje **PARP1**, který pomocí poly-ADP-ribosylace atrahuje proteiny reparační dráhy včetně XRCC1. **Reparace jednořetězcových zlomů (SSBR) DNA** tak probíhá identicky jako reparace DNA vláknka v rámci BER.

Průběh **nukleotidové excizní reparace (NER)** se liší na základě transkripční aktivity místa s poškozením DNA. Při **TC-NER** (transcription-coupled) je aktivačním signálem reparace zastavení postupu RNA polymerázy II při transkripci DNA. Zastavení způsobuje aktivaci dimeru **CSA** (ERCC8) / **CSB** (ERCC6), který odsunutím RNA polymerázy z vláknka DNA umožňuje jeho následnou opravu. **GG-NER** dráha probíhá bez ohledu na funkční stav chromatinu díky permanentní aktivitě senzorového proteinu **XPC**, aktivovaného při výskytu poruch struktury DNA dvoušroubovice. Interakci XPC s některými typy poškození (např. cyklobutanové adukty vznikající účinkem UV záření) zvyšují pomocné proteiny (DDB1, XPE a RAD23B, který po navázání XPC disociuje). Po rozpoznání defektu je do místa reparace navázán komplex **TFIIH**, jehož součástí jsou helikázy **XPB** (ERCC3) a **XPD** (ERCC2) rozvolňující strukturu dvoušroubovice DNA. Místo alterace na jednořetězcovém (ssDNA) vláknku DNA je rozpoznáváno proteinem **XPA** (za současného uvolnění XPC), který má centrální regulační úlohu v NER. Následně dochází k dvojitému přerušení ssDNA vláknka endonukleázami **XPF** (s navázaným kofaktorem ERCC1) a **XPG** (ERCC5). Po excizi ssDNA (24–32 b) obsahující alterované báze je vzniklý defekt zaplněn DNA polymerázou (POL δ / ϵ s procesivní podjednotkou PCNA) a reparace je dokončena pomocí DNA ligázy (LIG1).

APE1 – apurinic exonuclease 1; **CSA** – Cockayne syndrome A (ERCC8); **CSB** – Cockayne syndrome B (ERCC6); **DDB1** – DNA damage-binding protein 1; **DNA pol** – DNA polymerase; **ERCC1** – excision repair, complementing defective, in Chinese hamster, 1; **EXO1** – exonuclease 1; **FEN1** – flap structure-specific endonuclease 1; **LIG1** – ligase 1; **M** – metylový zbytek (H₂C–); **MGMT** – O⁶-metylguanotinmetyltransferáza; **MLH** – MutL homolog; **MMR** – mismatch repair; **MSH** – MutS homolog; **MUTYH** – MutY homolog (*E. coli*) glycosylase; **NEIL1** – Nei-like DNA glycosylase 1; **O⁶-meG** – O⁶-methylguanotin; **OGG1** – O⁸-oxoguanotin glycosylase; **PARP1** – Poly [ADP-ribose] polymerase 1; **PCNA** – proliferating cell nuclear antigen; **PNKP** – polynucleotid kináza 3-prime phosphatase (enzym, který odštěpí fosfátový zbytek z 3'-konce, aby zde vznikla 3'-OH skupina, která je zapotřebí pro polymeraci DNA polymerázou, nebo naopak fosforilyje 5'-konec DNA, aby DNA ligáza mohla zacelit finální „nick“); **RAD23B** – UV excision repair protein RAD23 homolog B; **RPA** – replikační protein A; **XPA-G** – xeroderma pigmentosum gene A-G; **XRCC1** – X-ray repair complementing defective in Chinese hamster, 1

přesnost DNA polymerázy je díky její korekční (*proof-reading*) aktivitě velmi vysoká a pravděpodobnost zařazení chybné báze se pohybuje v rozmezí 10⁻⁶–10⁻⁸, vznikají v rámci replikace genomu při buněčném dělení stovky záměn nukleotidů (mismatch) nebo krátkých inzercí či delecí. Chybně zařazené nukleotidy v DNA musí být nejprve rozpoznány senzorovými proteiny, následně vyštěpeny exonukleázou a vzniklý defekt je zacelen DNA polymerázou. Vrozené poruchy **MMR** genů jsou podstatou **hereditárního nepolypózního CRC (HNPCC, Lynchův syndrom)**, s vysokým celoživotním rizikem vzniku CRC (50–80 %), karcinomu endometria (40–60 %) a dalších nádorů (souhrnně do 10 %).

Význam mutací **MMR** systému je dokumentován buňkami s poruchou této reparační dráhy, které nabývají tzv. mutátorový fenotyp s řádovým zvýšením (12–40 mutací/Mbp) počtu záměn bází a krátkých inzercí a delecí.¹³⁾ Typickým projevem poruchy **MMR** systému je **mikrosatelitová instabilita (MSI)**, která vzniká v důsledku inzercí a delecí v oblastech mikrosatelitových sekvencí (obr. 1.4). Na vzniku MSI se nepodílejí defekty všech **MMR** genů identicky. Významné zvýšení MSI provází poruchy **MLH1**, **MSH2** a **PMS2**, zatímco poškození **MSH6** může být pravděpodobně kompenzováno aktivitou ostatních **MMR** genů a významnou MSI nezpůsobuje. Nádory s mutacemi v exonukleázové doméně genů pro polymerázu ϵ (**POLE**)

a polymerázu δ (**POLD1**) jsou obvykle MSS, ale vyznačují se extrémní přítomností záměn nukleotidů (s četností > 100 mutací / 1 Mbp).¹⁴⁾

Defekty genů **MMR** vedoucí k MSI jsou nejčastěji způsobeny hypermetylací promotoru **MLH1** genu u sporadických nádorů nebo mutacemi druhé alely u nosičů vrozených mutací genů **MSH2** a **MLH1** u pacientů s Lynchovým syndromem. Celkem lze MSI detekovat přibližně u 15 % CRC. Hodnocení MSI (obr. 1.4B) u vzorků nádorové tkáně se provádí vyšetřením několika genetických markerů (tzv. Bethesda panel obsahuje pět mikrosatelitních lokusů, v některých případech se používá lokusů více). Dle stanovené míry MSI lze nádory hodnotit jako:

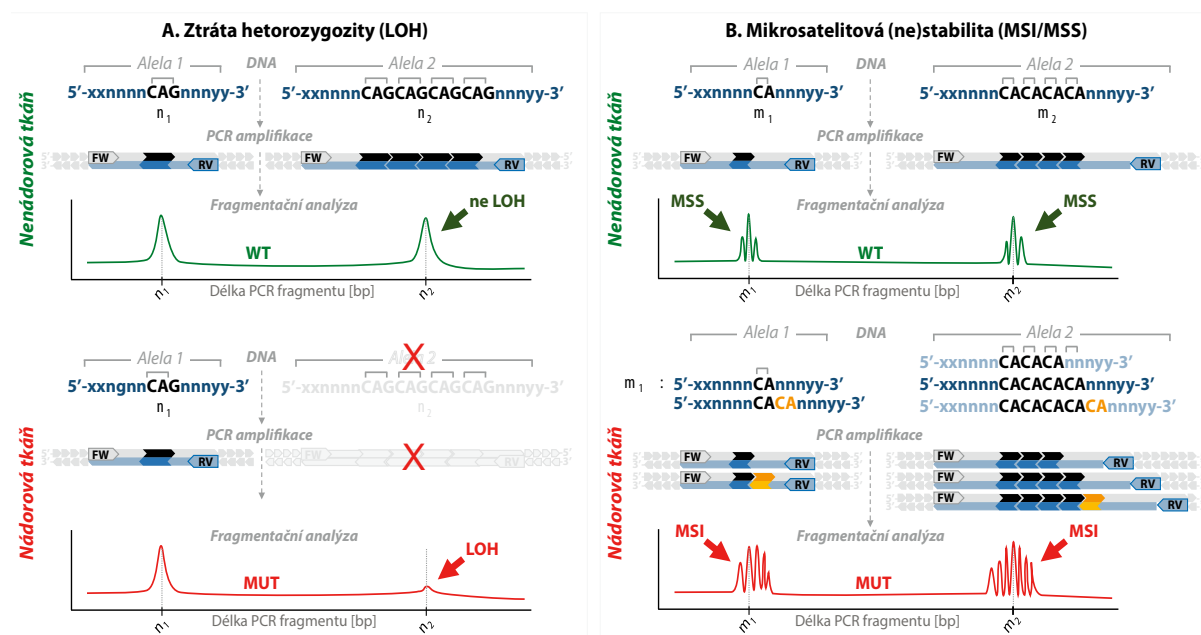
- MSI-H: nádory s vysokou (*high*) MSI; > 2 z 5 nebo > 30 % lokusů s MSI;
- MSI-L: nádory s nízkou (*low*) MSI; ≤ 2 z 5 nebo 10–30 % lokusů s MSI;
- MSS: nádory mikrosatelitně stabilní – bez MSI; 0 z 5 nebo < 10 % lokusů s MSI.

Alternativním stanovením MSI je imunohistochemická analýza exprese **MMR** genů (**MLH1**, **PMS2**, **MSH2** a **MSH6**) ve vzorcích nádorové tkáně nebo stále častěji NGS analýza.¹⁵⁾ Výskyt somatických mutací v exonukleázové doméně genů **POLE** a **POLD1** se analyzuje pomocí NGS.

Přítomnost MSI-H je univerzálním prediktorem odpovědi na léčbu pomocí PD-1 protilátek. U sporadických CRC je MSI-H přítomna u nádorů nižšího stadia (15–20 % stadium II a III vs. 5 % mCRC), u starších pacientů a u žen. Identifikace MSI-H je pozitivní prognostickou známkou (OS i DFS) onemocnění, a naopak negativním prediktorem léčby 5-FU.¹⁶ Výskyt mutací v exonukleázové doméně genů *POLE* a *POLD1* způsobuje vznik hypermutantního fenotypu u cca 10 % karcinomů endometria a 1 % CRC.^{14*}

Dominantní úloha **bázové excisní reparace (BER)** spočívá v opravách kovalentních modifikací dusíkatých bází (alkylace, oxidace, deaminace), které nevedou k významným strukturním změnám dvoušroubovice DNA.

Protože intermediátem BER je vznik jednořetězcového zlomu DNA, je tato dráha do značné míry zodpovědná i za reparaci jednořetězcových zlomů DNA. Prvotním krokem BER je odstranění strukturně poškozené báze z řetězce DNA za vzniku **abazického (AP) místa** pomocí DNA glykosyláz (obr. 1.3). Jeho následná oprava, bez ohledu na to, zda je AP místo intermediátem BER, nebo vzniklo spontánním odštěpením dusíkaté báze z nukleotidu, může probíhat krátkou dráhou (výměna jediného nukleotidu), nebo dlouhou dráhou (výměna polynukleotidového úseku obvykle v délce 2–13 bází).¹⁸ V obou případech dochází k doplnění defektu komplementárního vlákna DNA polymerázou a výsledný polynukleotidový řetězec je spojen DNA ligázami. Pomocí



Obr. 1.4 Změny v oblastech mikrosatelitových repetit. Repetitivní sekvence, ve kterých se opakují 1–6 bázové repetice (zde např. CAG nebo CA), mohou sloužit jako markery ztráty heterozygosity (LOH, *loss of heterozygosity*) nebo mikrosatelitové instability (MSI). Počet repetice je často v obou alelách odlišný ($n_1 \neq n_2$). Detekce změn repetitivních sekvencí spočívá v amplifikaci lokusu obsahujícího repetitivní sekvenci z nádorové a přilehlé nenádorové tkáně pomocí PCR [s primery FW a RV lokalizovanými před (xx), resp. za (yy) oblastí repetice (nnnCAGnnn, resp. nnnCAnnn)]. **A. Ztráta heterozygosity (LOH)** označuje stav, kdy dojde k výpadku (fyzickému chybění) jedné z alel genu v důsledku delece části chromozomu. Projeví se jako ztráta signálu jedné z alel při PCR amplifikaci a následné kapilární elektroforéze PCR fragmentů (fragmentační analýze). V praxi obvykle nacházíme při LOH snížení signálu, protože ve vzorku nádoru jsou přítomny i nenádorové buňky stromatu, které mají obě alely zachovány. Jedná se o typický děj inaktivace tumor supresorových genů (viz kap. 1.1). **B. Mikrosatelitová instabilita (MSI)** vzniká v důsledku chybné reparace mikrosatelitů při defektech MMR systému. V takovém případě lze v nádorové tkáni identifikovat oblasti obsahující repetice o různých délkách vznikající v důsledku kumulace neopravených replikačních chyb, které jsou v repetitivních sekvencích více pravděpodobné. Při MSI ukazuje výsledná fragmentační analýza polymorfismus délky PCR ampliconů v buňkách nádorové tkáně.

* Vyšetřením četnosti mutací ve vzorku nádorové tkáně lze získat informaci o mutační náloži (TMB, *tumor mutation burden*). Mezi MSI-H a high-TMB (obvykle > 10 mutací / 1 Mb) je vysoká, i když ne zcela absolutní korelace.¹⁷⁾

BER probíhá i **reparace jednořetězcových zlomů DNA** (SSBR, *single-strand break repair*), které jsou rozpoznávány proteinem PARP1. Inhibice PARP1 je důležitou protinádorovou strategií (viz dále).

Hereditární mutace genů kódujících reparační proteiny BER dráhy (v genech pro glykosylázy *MUTYH*, *NTHL1* nebo DNA polymerázy *POLE*, *POLD1*) jsou spojeny se vznikem hereditárních CRC.

Nukleotidová excizní reparace (NER) slouží pro odstranění alterací, které významně poškozuji strukturu (tvar) řetězce DNA (spíše než konkrétní modifikaci struktury DNA rozpoznává NER změnu „tvaru“ DNA). Reparace se odlišuje u alterací transkripčně aktivních genů (kdy alterace DNA interferuje s procesem transkripce; transcription-coupled **TC-NER**) a oprav transkripčně neaktivního genomu (global-genome **GG-NER**). NER zahrnuje rozpoznání místa defektu specifickými senzory proteiny (obr. 1.3). Následně je část vlákna DNA obsahující postižené místo vyštěpena a vzniklý defekt je doplněn DNA polymerázou podle antiparalelního vlákna DNA a zcelen DNA ligázou.¹⁹⁾

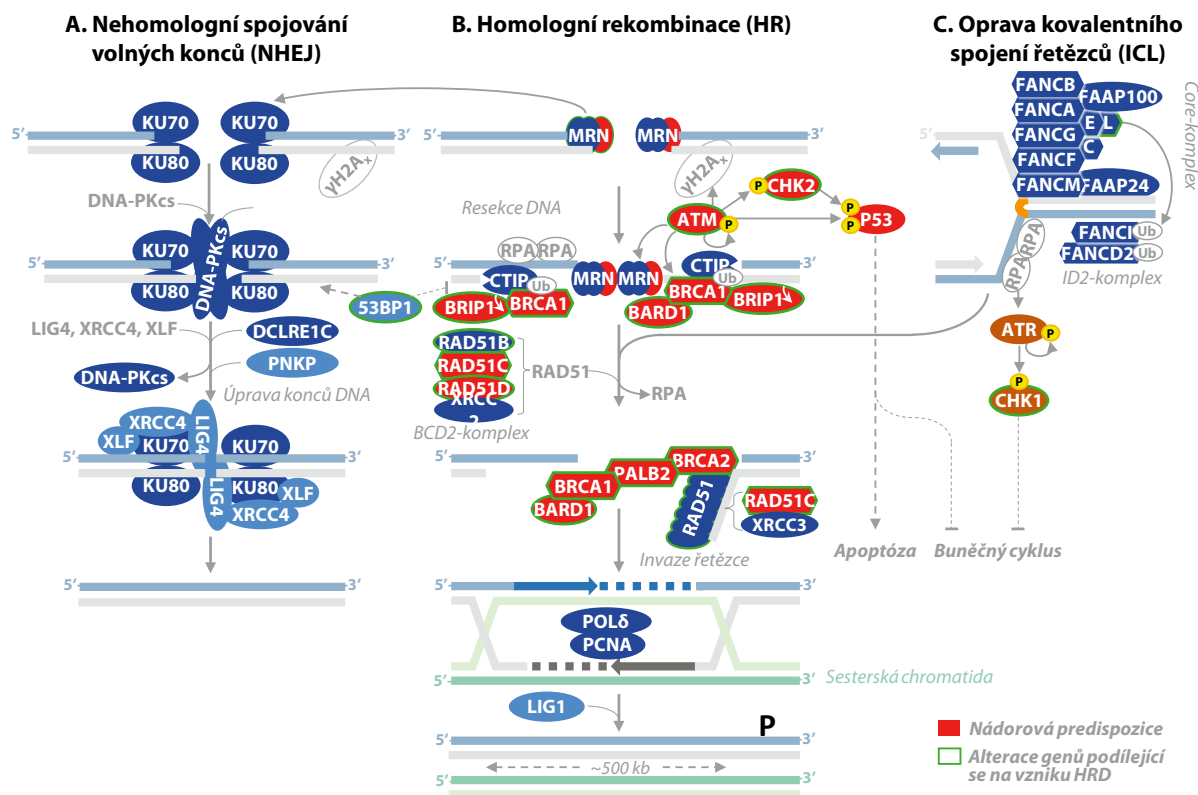
Aktivace NER je výrazně spjata s účinky UV záření, které způsobuje vznik dimerů tyminů a dalších fotoproduktů. Některé proteiny účastníci se NER mají však úlohu i v dalších DNA reparačních pochodech, z čehož vyplývá značná heterogenita onemocnění, která jsou způsobena vrozenými mutacemi genů kódujících faktory NER. Bialelické mutace genů kódujících faktory GG-NER způsobují onemocnění xeroderma pigmentosum (XPA-G), které se vyznačuje extrémní fotosenzitivitou a vysokým rizikem vzniku kožních malignit. Alterace genů dráhy TC-NER vedou k poruchám transkripčních komplexů, které poškozuji funkce buněk, což vede k jejich předčasnému stárnutí a indukci apoptózy. Nosiči bialelických, vrozených mutací v genech kódujících TC-NER jsou postiženi poruchami růstu a vývoje s progresivní neurodegenerací a progerií, jako tomu je např. u Cockaynova syndromu A (mutace genu *CSA/ERCC8*) nebo B (mutace genu *CSB/ERCC6*).

Dvouřetězcové zlomy DNA v dělicích se buňkách představují závažná poškození genomu s výrazným onkogenním potenciálem. Vznikají v důsledku pů-

sobení řady genotoxických inzultů endogenní (volné kyslíkové radikály, porucha replikační vidličky) i exogenní (ionizující záření, genotoxické chemikálie) povahy. Dvouřetězcové zlomy DNA mohou být také důsledkem neúspěšného průběhu reparace DNA pomocí NER či progresu poškození jednořetězcových zlomů DNA. Vznik dvouřetězcových zlomů v nádorových buňkách s nestabilním genomem je žádoucím cytotoxickým procesem vyvolaným řadou protinádorových chemoterapeutik a účinky radioterapie. Hlavními senzory přítomnosti dvouřetězcových zlomů DNA jsou proteiny KU70/KU80 a v S/G2 fázi buněčného cyklu MRN komplex, složený z proteinů MRE11, RAD50 a NBN.²⁰⁾ Reparace dvouřetězcových zlomů následně probíhá dvěma základními procesy: rychlou cestou nehomologního spojování volných konců DNA nebo komplikovaným, avšak vysoce přesným procesem homologní rekombinace (HR).*

Nehomologní spojování volných konců DNA (NHEJ; obr. 1.5A) je hlavní dráha oprav dvouřetězcových zlomů v lidských buňkách. Umožňuje rychlé, avšak nikoliv zcela bezchybné spojení přerušené DNA. NHEJ postupně zahrnuje rozpoznání a stabilizaci konců přerušené DNA, jejich případnou úpravu a ligaci zcelující řetězec DNA. Chyby indukované procesem NHEJ vyplývají z úprav konců přerušených řetězců před jejich spojením ligací, která nemůže proběhnout, jestliže konce přerušení nejsou symetrické či kompatibilní. V případě asymetrického přerušení jsou přesahující konce odstraněny, čímž může dojít k malým, ale v některých případech funkčně významným ztrátám úseků DNA. NHEJ reparace probíhá v několika modifikacích, které se týkají především úpravy konců přerušené DNA. Tzv. kanonická cesta NHEJ (cNHEJ, znázorněná na obrázku 1.5A) je zprostředkovaná aktivitou DNA-PK a způsobuje pouze malé úpravy konců přerušeného vlákna DNA. Při výrazně asymetrickém poškození probíhá reparace pomocí alternativní NHEJ dráhy (aNHEJ, viz poznámka), která může indukovat výraznější defekty DNA. Aktivace a reparace aNHEJ dráhy se účastní jiné mediátory (např. PARP1) a reparační proteiny (MRN komplex, LIG1, LIG3).

* Alternativní reparace dvouřetězcových zlomů probíhá pomocí dalších procesů, které jsou nejčastěji aktivovány při selhání hlavních reparačních drah (například v důsledku mutací či inaktivací klíčových reparačních proteinů). Alternativní dráha NHEJ, označovaná jako aNHEJ (na rozdíl od kanonické dráhy – cNHEJ), se popisuje také jako MMEJ (*microhomology-mediated end joining*), protože v rámci reparace jsou přerušená vlákna DNA spojena nejprve krátkým úsekem homologních sekvencí na antiparalelních řetězcích přerušených konců DNA. Jelikož tento proces stimuluje polymeráza Θ , je dráha nově označována též jako TMEJ (*theta-mediated end joining*). Podobnou náhradní reparační drahou je single-strand annealing (SSA), kterou od TMEJ odlišuje větší rozsah homologních úseků, jenž je potřeba ke spojení přerušených konců DNA (25–500 bp).²¹⁾



Obra 1.5 Hlavní dráhy oprav dvouřetězcových zlomů DNA. A. Aktivace **kanonické NHEJ** dráhy je zahájena aktivací **DNA-PK**. Její podjednotky (**KU70** a **KU80**) obkružují místo zlomu a ochraňují jej před extenzivní resekci. Aktivací dimeru KU70/KU80 dochází k navázání a aktivaci DNA-PKcs kinázy, která přemostuje konce přerušené DNA a fosforyluje histon H2AX. Fosforylace H2AX – vznik γ H2AX – je charakteristickou známkou reparační dráhy dvouřetězcových zlomů. Následně DNA-PKcs uvolňuje místo exonukleáze **DCLRE1C** (Artemis) upravující konce přerušené DNA, na čemž se podílejí i další proteiny (např. PNKP). KU70/KU80 následně slouží pro navázání komplexu **XRCC4-LIG4**, ve kterém pomocnou úlohu sehrává XLF. LIG4 zodpovídá za spojení přerušných konců DNA. **B. HR** iniciuje trimerní senzorový **MRN komplex**, složený z exonukleázy **MRE11**, proteinu **RAD50** spojujícího přerušené konce DNA a nibrinu, **NBN**, proteinu s řadou protein–proteinových interakcí (včetně ATM, CTIP, γ H2AX). MRN komplex je aktivován proteinem **CTIP**, který je v průběhu G2/S fáze buněčného cyklu fosforylován CDK2. Aktivitou MRN komplexu s CTIP je zahájena resekce jednoho vlákna DNA za vzniku dlouhých jednořetězcových (ss) úseků DNA, které jsou nezbytné k vyhledání homologní sekvence na sesterské chromatidě. Kromě toho se MRN komplex podílí na aktivaci **ATM** kinázy, fosforylující některé proteiny HR (např. BRCA1) a proteiny integrující HR do dalších signálních drah v buňce (zástava buněčného cyklu a v případě neúspěšné reparační dráhy indukce apoptózy; **CHK2**, **P53**). V rámci HR vzniká rozsáhlý komplex proteinů (reparační ohnisko), ve kterém důležitou úlohu sehrává **BRCA1**, platformní protein umožňující dynamickou interakci proteinů v reparačním ohnisku (včetně helikázy **BRIP1** a CTIP). BRCA1 se svým vazebným partnerem BARD1 vykazuje ubikvitinligázovou (Ub) aktivitu. Monoubikvitinylace reparačních proteinů neslouží k jejich degradaci, ale má regulační funkci. Prevenci vzniku sekundárních struktur a ochranu resekované ssDNA zajišťují **RPA** proteiny následně nahrazené rekombinázou **RAD51**. Jejím hlavním úkolem je přemístění opravovaného ssDNA úseku do homologní oblasti sesterské chromatidy. Před tím se na konec opravované dsDNA s pokračujícím resekovaným úsekem ssDNA váže protein **BRCA2**, který polymeraci RAD51 stimuluje. Aktivace RAD51 se účastní **BCD2** komplex (složený z **RAD51B/RAD51C/RAD51D/XRCC2**). Stabilitu filamentární struktury RAD51 ovlivňuje komplex **RAD51C/XRCC3**. Po hybridizaci ke komplementárnímu úseku DNA na sesterské chromatidě je chybějící část DNA dosyntetizována DNA polymerázou a integrita dsDNA je obnovena DNA ligázou. **C.** Pomocí HR probíhá **oprava kovalentních spojení mezi řetězci DNA (ICL, interstrand crosslinks)**, které brání replikaci DNA v S fázi buněčného cyklu. Na této reparační dráze se podílejí proteiny skupiny Fanconiho anémie (FA). Oblast ICL je rozpoznávána **FANCM** za asistence **FAAP24**, který katalyzuje vznik tzv. **core komplexu** (FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, FAAP100), který obsahuje ubikvitinligázu FANCL monoubikvitinylující FANCI/FANCD2 (tzv. ID2) komplex. ID2 komplex aktivuje FA nukleázy – SLX4 (FANCP) a XPF (FANCF) – a další reparační proteiny – BRIP1 (FANCI), PALB2 (FANCD1), BRCA2 (FANCD1), BRCA1 (FANCS), RAD51C (FANCO).

53BP1 – TP53-binding protein 1; **ATM** – ataxia-telangiectasia mutated; **ATR** – ataxia-telangiectasia mutated and Rad3-related; **BRCA1** – breast cancer gene 1 (FANCS); **BRCA2** – breast cancer gene 2 (FANCD1); **BRIP1** – BRCA-interacting protein (BACH1 – BRCA1-associated C-terminal helicase-1, FANCL); **CTIP** – CTBP-interacting protein (RBBP8 – retinoblastoma binding

protein 8); **DCLRE1C** – DNA cross-link repair 1C (Artemis); **DNA-PKcs** – DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit; **FAAP** – FA-associated protein; **FANCA-S** – Fanconi anemia protein A–S; **H2AX** – histon H2AX; **γH2AX** – fosforylovaná forma histonu H2AX; **HR** – homologous recombination; **CHK1** – checkpoint kinase 1 (CHEK1); **CHK2** – checkpoint kinase 2 (CHEK2); **KU70** – Ku 70 protein (XRCC6); **KU80** – Ku 80 protein (XRCC5); **LIG4** – DNA ligase 4; **MRE11** – meiotic recombination 11 homolog A; **MRN** – MRE11-RAD50-NBN complex; **NBN** – nibrin (NBS1); **PNKP** – polynucleotide kinase 3'-phosphatase; **RAD50** – RAD50 homolog; **RAD51B** – RAD51 homolog B (RAD51L1); **RAD51C** – RAD51 homolog C (FANCO); **RAD51D** – RAD51 homolog D (RAD51L3); **RIF1** – RAP1 interacting factor homolog; **RPA** – replication protein A; **Ub** – ubiquitin; **XL** – XRCC4-like factor (NHEJ1); **XRCC3** – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3; **XRCC4** – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4

Prostřednictvím **homologní rekombinace (HR; obr. 5B)** jsou s vysokou přesností reparovány dvouřetězcové zlomy v průběhu buněčného cyklu v S a G2 fázi (viz kap. 1.3 *Poruchy proliferace nádorových buněk*), kdy je přítomna sesterská chromatida poskytující předlohu (templát) pro rekonstrukci chybějícího úseku DNA. Proces HR zahajuje MRN komplex, jehož úkolem je iniciace reparačního procesu, počáteční úprava místa zlomu (s případným odštěpením kovalentně navázaných proteinů na DNA, tzv. proteinových aduktů) a aktivace ATM kinázy, která zajišťuje sladění DNA reparace s dalšími intracelulárními signálními pochody. Následně exonukleázy odstraní jeden z řetězců přerušeno vlákna DNA za vzniku dlouhých jednořetězcových (ssDNA) přesahů na obou koncích zlomu. Jednořetězcové přesahy jsou pomocí RAD51 rekombinázy přemístěny do oblasti sesterské chromatidy, která slouží jako templát pro doplnění chybějící genetické informace. HR je komplexní děj, kterého se účastní desítky proteinů vytvářejících rozsáhlé multi-proteinové komplexy. Význam HR v tumorigenezi dokumentuje výrazný sklon ke vzniku dědičných nádorových onemocnění u heterozygotních nosičů zárodečných mutací v řadě genů kódujících proteiny HR. Nejčastěji se tyto mutace vyskytují v **hlavních predispozičních genech pro vznik karcinomu prsu a ovaria – BRCA1 a BRCA2**.

Procesem úzce souvisejícím s HR je **reparace kovalentních meziretězcových vazeb (obr. 1.5C)**. Kovalentní spojení mezi řetězci DNA (*DNA interstrand crosslink* – ICL, zesíťování DNA) je závažné postižení, které brání procesu replikace a transkripce. Počáteční fázi reparace ICL zajišťuje skupina proteinů kódovaných geny **Fanconiho anemie (FA)**, které vytvářejí rozsáhlý aktivací komplex. Konečný proces opravy DNA je totožný s homologní rekombinací. Vrozené bialelické mutace (u pacientů je mutace přítomna v obou alelách, matérní i paternální) v některém z více než 20 FA genů způsobují FA, vzácná autozomálně recesivní onemocnění charakterizovaná poruchami krvetvorby, růstovými defekty a extrémně zvýšeným rizikem vzniku nádorových onemocnění, především AML. Nosiči monoalelických mutací v některých FA genech jsou ohroženi vznikem

dědičných nádorových onemocnění (**obr. 1.5C**). Nosičky mutací v genech *BRCA1 (FANCS)* a *BRCA2 (FANCD1)* jsou ohroženy vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu a ovarii (celoživotní riziko až 80 % a 60 % pro karcinom prsu a až 60 % a 30 % pro karcinom ovaria), ale i dalších nádorů (především karcinomu pankreatu; viz www.onkogenetika.cz). U mužů je pak problematika vyjádřena zvýšeným rizikem onemocnění karcinomy pankreatu, prostaty a prsu. Zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění je však dokumentováno i pro nosiče mutací v dalších FA genech, jako je *PALB2 (FANCN)*; karcinom prsu a pankreatu) nebo *RAD51C (FANCO)*; karcinom prsu a ovaria).

Pro zachování neporušenosti genomu a prevenci nádorové transformace je nezbytné, aby byly v buňce kompetentní obě reparační dráhy – HR i NHEJ. Opravy pomocí NHEJ probíhají v průběhu celého buněčného cyklu, v S a G2 fázi obě cesty kompetují. Třebaže NHEJ reparace umožňuje zavedení chyb do genomu, je především rychlost této reparace DNA patrně důvodem pro upřednostnění NHEJ jako hlavní reparační dráhy oprav dvouřetězcových zlomů v lidských buňkách. Rozhodnutí o volbě konkrétní reparační dráhy závisí na fázi buněčného cyklu, charakteru konců přerušeno DNA, jejich rozpoznání konkrétními senzorovými proteiny, jejich enzymatické úpravě nebo aktivitě řady regulačních proteinů. Preference reparace DNA s ohledem na fázi buněčného cyklu nespočívá pouze v dostupnosti sesterské chromatidy pro HR, která je přítomna až při replikaci DNA v S fázi, ale také na dostupnosti konkrétních reparačních proteinů (např. exprese *RAD51* rekombinázy pro HR se významně zvyšuje až v průběhu S fáze). Řada aspektů výběru reparačního procesu není přesně popsána. Regulační proteiny (např. CTIP, 53BP1) ovlivňují, s ohledem na fázi buněčného cyklu, DNA reparační pochody aktivací či inhibicí proteinů a proteinových komplexů zahajovací částí HR a NHEJ, čímž směřují opravný mechanismus k rychlé NHEJ reparaci nebo přesné HR.²²⁾

V kapitole 1.1 jsme uvedli, že poruchy genomové integrity jsou jednou z určujících charakteristik nádorových buněk (**tab. 1.2**). S ohledem na reparaci dvouřetězcových zlomů DNA se poruchy reparačních procesů

v nádorových buňkách týkají téměř výlučně reparační dráhy HR, která je v části nádorů nefunkční v důsledku inaktivací genů, které se na procesu HR podílejí. U takovýchto nádorů hovoříme o **defektu HR (HRD, homologous recombination deficiency)**. Identifikace pacientů se somatickými nebo dědičnými mutacemi v genech kódujících proteiny HR má značný prognostický, ale především prediktivní význam s ohledem na zvýšenou odpověď pacientů s dědičnými mutacemi na chemoterapeutika působící vznik dvouřetězcových zlomů a ICL (deriváty cisplatin) a pro léčbu indukující syntetickou letalitu nádorových buněk (viz dále). Stanovení HRD není zatím rutinní diagnostickou metodou.²³⁾ **HRD lze detekovat** různými přístupy:

- na základě přítomnosti somatických/dědičných mutací v genech pro HR (*BRCA1, BRCA2, PALB2* a dalších; obr. 1.5) pomocí NGS (viz kap. 1.2.4 Analýza alterací DNA),
- funkčními testy, které identifikují vznik reparačních komplexů obsahujících RAD51 rekombinázu (respektive jejich chybění v případě HRD),
- identifikací tzv. genetických jizev (*genomic scars*) – patologických projevů přítomnosti HRD, které zahrnují detekci kombinací LOH a intrachromozomových a intragenomových přestavb.

V současnosti používané (obvykle komerční) testy HRD kombinují výše uvedené přístupy v podobě agregovaných skóre.²⁴⁾

Poly-(ADP-ribóza)-polymeráza 1 (PARP1) a její inhibice

DNA reparační pochody mají zásadní význam pro udržení genomové integrity. Kromě sdílení proteinů angažovaných v různých reparačních drahách (např. exonukleáza EXO1 nebo DNA polymerázy) má řada reparačních systémů společné regulační nebo exekutivní mechanismy integrující signalizaci po poškození DNA s dalšími intracelulárními signálními ději, jako je regulace buněčného cyklu či apoptózy (viz kap. 1.3 Poruchy proliferace nádorových buněk).

Důležitými regulačními proteiny oprav genomové DNA jsou proteiny z rodiny poly-(ADP-ribóza)-polymeráz (PARP) katalyzující přenos zbytků ADP-ribózy (poly-ADP-ribozylace, nazývaná též **PARylace**) na širokou škálu cílových proteinů. Kovalentní připojení řetězců složených z ADP-ribózy je molekulárním znakem poškození DNA a signálem pro asociaci proteinů zprostředkávajících její opravy. Z řady zástupců PARP rodiny je nejvíce studovaným proteinem PARP1, který

se hlavní měrou podílí na regulaci DNA reparačních dějů (obr. 1.6).

Inhibice PARP1 je nástrojem pro **indukci syntetické letality** – farmakologicky navozené inhibice DNA reparačních pochodů ovlivněných PARylací u pacientů s poruchou DNA reparace, jakou je přítomnost vrozených mutací v genech kódujících proteiny HR nebo získaných mutací u pacientů s HRD.

Syntetická letalita v důsledku inhibice PARPi vede u pacientů s HRD ke katastrofickému rozpadu genomu, což se odráží v dobré léčebné odpovědi na PARPi a relativně malé toxicitě léčby. Bohužel, léčba PARPi je provázána vznikem rezistence u většiny léčených pacientů, na které se podílí řada faktorů:²⁵⁾

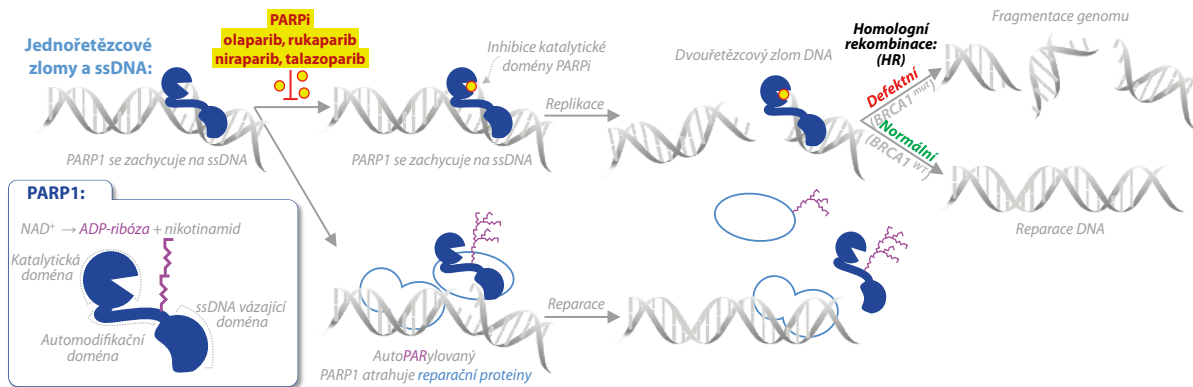
- oprava defektu HR v důsledku sekundárních somatických mutací nahrazujících úplně, nebo alespoň částečně funkci defektních HR genů,
- zvýšená exprese kanálů a transportérů exportujících léčivo z buňky,
- poruchy cílové molekuly PARP1 negativně ovlivňující inhibici PARPi a obnovení PARylačního potenciálu,
- stabilizace replikační vidličky.

Je pravděpodobné, že koncept syntetické letality bude použitelný i v řízené inhibici dalších DNA reparačních drah. V současné době je ve stadiu klinického hodnocení řada inhibitorů proteinů podílejících se na reparaci dvouřetězcových zlomů a inhibitorů proteinů intracelulární odpovědi poškození DNA – ATM a ATR a jejich substrátů CHK1 a CHK2.²⁶⁾

1.2.3 Epigenetické změny

Vývoj maligních nádorů není podmíněn pouze genetickými alteracemi vedoucími ke změnám v sekvenci DNA, ale podílejí se na něm i **epigenetické změny**. Tento druh modifikací struktury genomu se může dotýkat samotné DNA, jako je tomu v případě **metylace cytosinů v CpG ostrovech** promotorových oblastí genů (obr. 1.7), která je zodpovědná za následné umlčení genové exprese. Dlouho jsou známy inhibitory DNMT (azacytidin byl syntetizován v roce 1964 na ÚOCHB AV ČR), avšak jejich přínos pro léčbu solidních nádorů je předmětem výzkumu.²⁷⁾

Významnou změnou je rovněž ovlivnění vyšší organizační struktury nukleoproteinového komplexu chromatinu, složeného z DNA navinuté na histonové oktamer (nukleozomy). Kovalentní modifikace histonů, jako jsou acetylace zprostředkované histonacetyl-



Obr. 1.6 PARP1 a působení PARP1 inhibitorů (PARPi). PARP1 obsahuje několik funkčních domén (vlevo dole). DNA vázací doména interaguje se ssDNA, automodifikační doména je schopna autokatalytické PARylace, kterou zajišťuje katalytická doména. V přítomnosti poruch DNA, jako jsou přerušení jednoho nebo obou řetězců dvouřetězcové DNA (viz obr. 1.3), je PARP1 aktivován a katalyzuje přenos ADP-ribózy z NAD⁺ (nikotinamidového kofaktoru sloužícího v buňkách k přenosu redukčních ekvivalentů) na cílové proteiny včetně sebe sama. PARylované molekuly PARP1 přitahují do místa poškození DNA reparační proteiny (např. XRCC1 v průběhu BER) obnovující integritu DNA řetězce. Při inhibici PARP1 pomocí PARPi dochází k zachycení nemodifikovaného proteinu PARP1 na DNA, což v intenzivně dělících se buňkách koliduje s replikačním aparátem, způsobuje rozpad replikační vidličky a vznik dvouřetězcových zlomů. V buňkách s normální HR se dvouřetězcové zlomy opraví pomocí této reparační dráhy, což u pacientů s HRD není možné.

Prvními pacienty léčenými pomocí **inhibitorů PARP1 (PARPi)** byli nemocní se zárodečnými patogenními mutacemi v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*. U těchto nemocných lze předpokládat, že rozvoj nádorového onemocnění souvisí s inaktivací druhé, zdravé alely v nádorových buňkách (v důsledku hypermetylace promotoru *BRCA1* či *BRCA2* nebo ztrátou alel při somatických chromozomálních přestavbách genových lokusů *BRCA1/BRCA2* genů v nádorových buňkách). Z důvodů poškození HR, ve které proteiny *BRCA1* a *BRCA2* sehrávají klíčovou úlohu, mohou nádorové buňky u nosičů *BRCA1* nebo *BRCA2* mutací reparovat vznik dvouřetězcových zlomů pouze pomocí NHEJ reparační dráhy. Jestliže v těchto nádorových buňkách zvýšíme počet dvouřetězcových zlomů (působením cisplatin nebo inhibicí PARP, která poškodí BER, a jednořetězcové zlomy budou progredovat do vzniku dvouřetězcových zlomů DNA), dojde v nádorových buňkách ke kritickému poškození genomu, které povede k jejich zániku. Nadto PARP1 indukuje aktivaci alternativní NHEJ dráhy s výrazně vyšší tendencí ke vzniku mutací v DNA. V nenádorových buňkách u nosičů zárodečných mutací léčených PARPi kritické selhání reparační dráhy dvouřetězcových zlomů nenastane, protože mají zachovanou funkci *BRCA1* a *BRCA2* (díky expresi proteinu z nemutované alely) zajišťující reparaci pomocí HR.

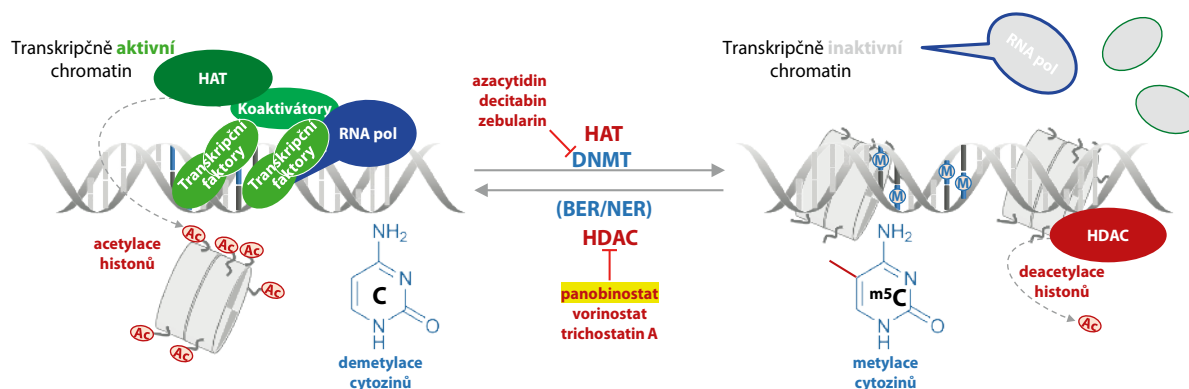
transferázami (HAT; obr. 1.7), uvolňují DNA, a tím ji zpřístupňují pro genomovou expresi, usnadňují navázání transkripčních faktorů a RNA polymerázy. Opačný účinek vykonávají histondeacetylázy (HDAC), které kondenzaci chromatinu zvyšují. Epigenetické modifikace například významným způsobem ovlivňují genomovou expresi tumor supresorových genů, která je v mnohých nádorových buňkách potlačena.

Klinicky významná je například již dříve zmiňovaná hypermetylace promotoru *MGMT* genu u pacientů s gliomy.

Aberantní acetylace také ovlivňuje vývoj nádorových onemocnění. Zvýšená exprese HDAC v některých nádorech se může podílet na inaktivaci tumor supresorových genů. Proto je logické, že jsou vyvíjeny a testovány inhibitory HDAC. První z této lékové skupiny – panobinostat – již byl schválen FDA k terapii mnohočetného myelomu.

1.2.4 Analýza alterací DNA

Identifikace patogenní mutace (mutací) a epigenetických změn v nádorové tkáni je důležitým parametrem určujícím prognózu onemocnění a prediktivním faktorem determinujícím cílenou léčbu. V rámci analýzy somatických mutací je nezbytné správně charakterizovat patogenní alterace v komplexním vzorku nádoru, kde samotné maligní buňky (obsahující různé somatické mutace DNA, které vznikly v průběhu života a které jsou zodpovědné za nádorovou transformaci, a další alterace genomu, jako jsou epigenetické změny) tvoří často jen malou celulární komponentu ložiska tumoru. Analýza nemusí zahrnovat pouze vyšetření nádorové tkáně. Stanovení hypermetylace DNA a i některých mutací lze provést i analýzou **volné cirkulující (cell-free) DNA (cfDNA)**, která se uvolňuje do cirkulace



Obr. 1.7 Metylace (M) cytosinu (C) na 5-metylcytosin (m^5C) v CpG dinukleotidech lokalizovaných v promotorových oblastech genů je katalyzována DNA-metyltransferázami (DNMT). Methylace negativně ovlivňuje míru genové exprese (transkripce genů), protože m^5C znemožňuje sekvencně specifickou vazbu transkripčních faktorů do oblasti promotoru v místech modifikovaných metylací. Tím nemůže dojít k vytvoření transkripčního komplexu, který obsahuje nejen transkripční faktory, ale rovněž jejich koaktivátory sloužící pro aktivaci komplexu DNA-dependentní RNA polymerázy II a histonacetyltransferázy (HAT) rozvolňující vazbu DNA na nukleozomy acetylací histonů. Acetylace snižuje kladný náboj histonů a tím jejich nespecifickou vazbu se záporně nabitou molekulou DNA, která je tak dostupnější pro interakci s transkripčním aparátem. Methylace DNA i acetylace histonů jsou reverzibilní děje. Odstranění metylové skupiny probíhá obvykle pomocí DNA reparačního systému BER nebo NER. Odstranění acetylové skupiny z histonů vykonávají histondeacetylázy (HDAC).

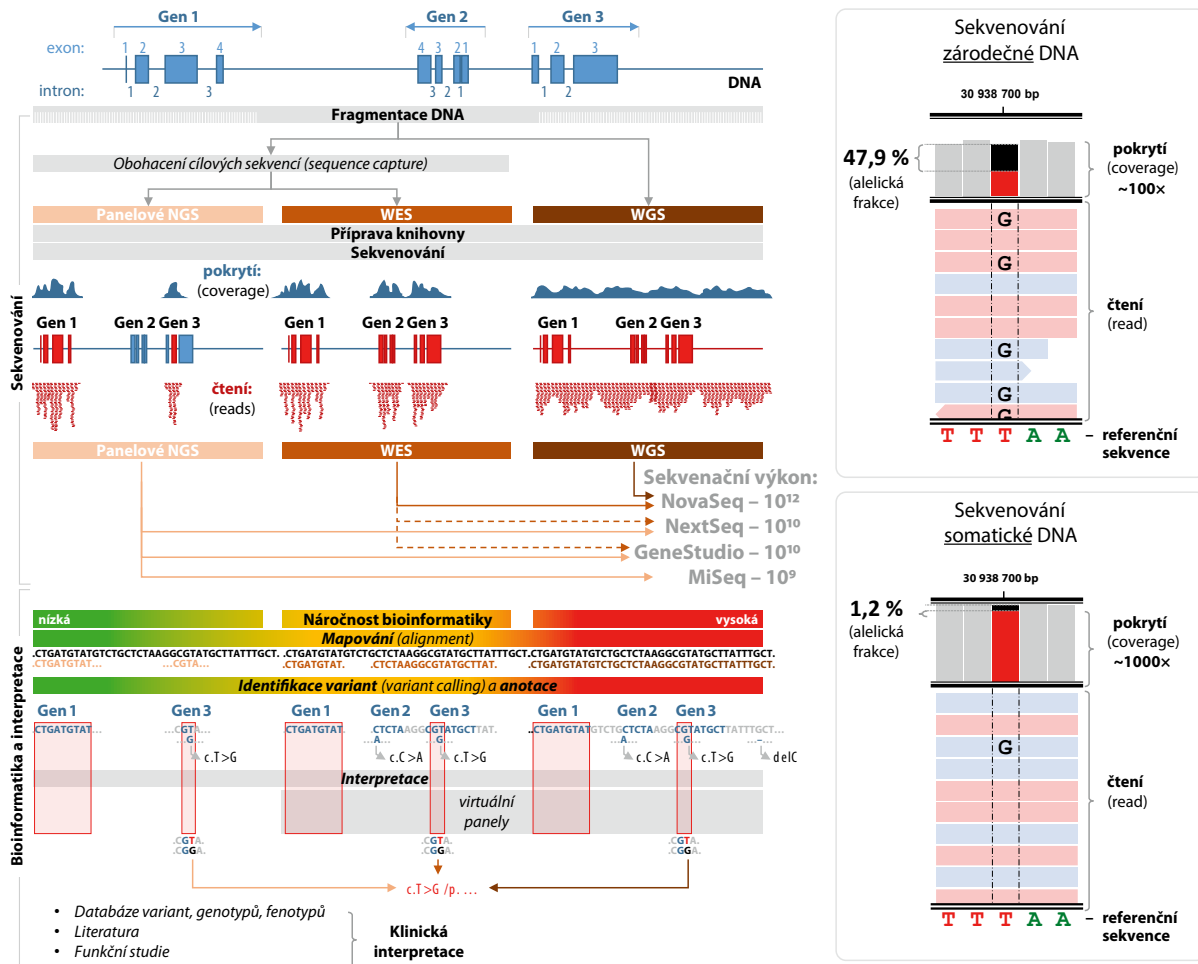
rozpadem nádorových buněk komunikujících s cévním řečištěm.

Významným milníkem, který umožnil zásadní proměnu v analýze somatických i hereditárních alterací DNA, je zpřístupnění **sekvenování nové generace (NGS)** pro klinickou praxi. To řádově zvýšilo možnosti detekce zárodečných i somatických genetických alterací u onkologických pacientů (obr. 1.8). Přestože můžeme již v současné době analyzovat celý genom jedince, z důvodu stále poměrně vysokých nákladů, ale především extenzivních nároků na bioinformatické zpracování, je celogenomové sekvenování (WGS, *whole genome sequencing*) spíše doménou výzkumu. Cílené sekvenování umožňuje analýzu předem cíleně obohacených, vybraných úseků DNA (tzv. amplikonové nebo panelové sekvenování). Rozšířenou možností panelového sekvenování je sekvenování exomů – oblastí kódujících strukturní geny (WES, *whole exome sequencing*). Ohromný sekvenační výkon NGS umožňuje velkou variabilitu diagnostických přístupů; templátem NGS analýz nemusí být pouze genomová DNA ze vzorku somatické tkáně či nádoru, ale také cDNA (jako produkt reverzní transkripce z RNA, mRNA či miRNA), cfDNA či DNA po modifikaci bisulfitem (pro analýzu metylací).

Pro správnou identifikaci molekulárních cílů cílené léčby je nezbytné určit genetické změny, které skutečně zodpovídají za nádorovou transformaci (řídí ji; tzv. **driver**

mutace). Jejich odlišení od alterací DNA, které s nádorovou transformací nesouvisí (tzv. **passenger mutace**) a vznikají jako průvodní jev porušených DNA reparačních pochodů při mnohaletém průběhu kancerogeneze, je klíčovou úlohou **molekulární patologie**. Genetický „vzorec“ nádorové tkáně (primárního nádoru nebo metastáz) se může v čase měnit podle toho, jak v nádorovém ložisku převládají různé buněčné klonální populace vznikající v důsledku genetické nestability nádorových buněk a klonální selekce pod tlakem protinádorové léčby. Molekulárněgenetické vyšetření tvoří základ pro fungování **molekulárních tumor boardů** (týmů složených z onkologů, patologů, molekulárních biologů, genetiků, farmakologů a dalších specialistů), představujících indikační komise pro precizní molekulární onkologii.

Identifikace **hereditárních mutací** v nádorových predispozičních genech, interpretace závažnosti nalezených genetických variant a odhad míry rizika vzniku nádorového onemocnění je předmětem **onkogenetiky**, která vyžaduje mezioborovou spolupráci onkologů, genetiků a dalších specialistů s ohledem na zvýšená rizika konkrétních nádorových onemocnění. Indikace a především interpretace genetického vyšetření germinálního genomu vyžaduje specializovanou genetickou konzultaci, protože individuální nález je pro probanda celoživotně neměnný a dotýká se nejen jeho životního osudu, ale ovlivňuje i životy jeho příbuzných.



Obr. 1.8 Sekvenování nové generace (NGS) umožňuje identifikaci germinálních i somatických variant v DNA. Příčinné mutace (driver varianty) se nejčastěji vyskytují v kódujících oblastech (exony) a k nim přiléhajících úsecích nekódujících oblastí (intronů). Oblasti zájmu (např. exony vybraných tumor supresorových genů či onkogenů) je možné selektivně „vychytávat“ při panelovém sekvenování. Při celoomomovém sekvenování (WES) jsou vychytávány všechny kódující oblasti lidského genomu. Celogenomové sekvenování (WGS) nezahrnuje obohacení a cílovou oblastí je celý genom vyšetřované osoby. Přípravy sekvenačních knihoven a vlastní proces sekvenování se u jednotlivých typů sekvenování příliš neliší. Odlišný je však vyžadovaný sekvenační výkon nezbytný k dobrému pokrytí (přečtení) cílových oblastí jednotlivými „ready“ (unikátními čteními z náhodně nafragmentovaného úseku DNA), který je nejmenší u panelového sekvenování (cílová oblast je ~ 0,1–1,0 Mbp), větší u WES (3–60 Mbp) a extrémní u WGS (> 3 Gbp). V rámci analýz zárodečného genomu je uspokojivé pokrytí přibližně 100× čtení jednotlivé báze v oblasti zájmu, protože identifikujeme především variantní homozygoty a heterozygoty s 100% nebo 50% zastoupením variantní alely v genomu.

Na obrázku vpravo nahoře vidíme alelickou frakci 47,9 % odpovídající 46× čtení variantní alely G a 49× čtení WT (referenční) alely T při celkovém pokrytí 95×. Řádově vyšší pokrytí potřebujeme při analýzách somatických variant (500–1000×), při kterých se snažíme identifikovat genetické varianty v heterogenních nádorových buňkách (reprezentujících různé klonální populace) rozptýlených v buňkách stromatu (s normálním nemutovaným genomem). Na obrázku vpravo dole vidíme situaci, kdy byla zachycena 15× alela G a 1232× alela T, což by v případě heterozygotní varianty znamenalo, že takovýto klon nádorových buněk je ve vzorku zkoumané tkáně zastoupen v přibližně 2,4 %. Uvedeným nárokům odpovídá i výstup (počet sekvenovaných bází), který u WES řádově překonává panelové sekvenování, o WGS nemluvě. Velikost sekvenačního výstupu vyžaduje odpovídající sekvenační analyzátor, jehož kapacita (i cena) je v širokém rozmezí umožňujícím řešení výše uvedených situací. V současnosti je v klinické praxi rovněž podstatnou limitací bioinformatické zpracování sekvenačního výstupu. Pro panelové NGS, WES i WGS je bioinformatická analýza obdobná, ale v uvedené posloupnosti stoupá náročnost na výpočetní výkon, strojový čas, migraci dat, datová úložiště úměrně velikosti cílové oblasti násobené pokrytím. Bioinformatická analýza zahrnuje především namapování sekvenačních čtení (10^5 – 10^{10}) na referenční sekvenci, identifikaci variant a jejich anotaci. V případě použití

WES a WGS se interpretují obvykle pouze varianty v logické oblasti zájmu, kterou můžeme libovolně definovat, na rozdíl od panelového sekvenování, kde je oblast zájmu definována fixně. Interpretace zahrnuje komplexní postup, kdy je nalezená varianta posuzována s ohledem na dopad na kódující sekvenci (c.; případně na mRNA – r.) a výslednou sekvenci proteinu (p.). Varianty jsou klasifikovány na základě mezinárodních doporučení. Klinická interpretace se liší v závislosti na skutečnosti, zda se jedná o sekvenování germinálních, nebo somatických variant.

bp – pár bází; **Gbp** – gigabáze (10^9 bp); **Mbp** – megabáze (10^6 bp)

1.3 Poruchy proliferace nádorových buněk

Zdeněk Kleibl

Na začátku bylo uvedeno, že základní charakteristikou maligního nádorového onemocnění je jeho expanzivní růst napříč výstavbovým plánem organismu. Růst nádorových buněk je stejně jako růst buněk fyziologických populací regulován na buněčné úrovni dvěma základními pochody. Zatímco aktivací buněčného cyklu dochází ke zvyšování počtu buněk v důsledku jejich dělení, aktivací apoptózy buňky zanikají. U všech nádorových onemocnění se pravděpodobně vždy jedná o kombinovanou poruchu obou dějů zapříčiňující, že se nádorové buňky excesivně dělí a méně příčinnivě zanikají.

1.3.1 Buněčný cyklus a jeho poruchy

Hyperproliferace je charakteristickou známkou nádorové transformace umožňující růst maligních buněk v primárním nádoru i metastatických ložiscích. Novotvorba nádorových buněk vyplývá z porušené regulace jejich buněčného cyklu, biochemického programu zajišťujícího vznik dvou dceřiných buněk z jedné buňky mateřské. Buněčný cyklus probíhá téměř identickým způsobem ve všech somatických dělicích se buňkách v organismu. Za normálních okolností se většina buněk ve tkáních nachází v klidové, tzv. **G0 fázi**, kdy i přes intenzivně probíhající intracelulární metabolismus a zapojení buňky v plnění specializovaných úkolů příslušné tkáně nedochází k přípravě na buněčné dělení. Tento stav se projevuje tím, že buňky nacházející se v klidové fázi neexprimují specifické proteiny regulující buněčný cyklus (např. cykliny). Za fyziologického stavu je vstup buňky do buněčného cyklu umožněn při splnění několika základních podmínek:

- Dělení buňky musí být pozitivně stimulováno soustavou mitogenní signalizací (např. růstovými fak-

tory, cytokiny) převyšující antiproliferační signalizaci (např. TGF β , E-kadherin).

- K dělení může dojít pouze v buňce s intaktním genomem, neboť poškození DNA (především přítomnost dvouřetězcových zlomů) způsobuje aktivaci DNA reparačních pochodů a kontrolních mechanismů (ATM/CHK2/P53 nebo ATR/CHK1) inhibujících buněčný cyklus.
- Pro dělení musí mít mateřská buňka dostatek stavebních substrátů (především deoxynukleotidtrifosfátů pro syntézu DNA) a energie (ve formě ATP).

V rámci vlastního buněčného cyklu dochází v somatických buňkách ke kopírování genomové DNA procesem replikace a růstu buněčných komponent. Na konci buněčného cyklu jsou zdvojený genom, buněčné organely a struktury (např. membrány) symetricky rozděleny z mateřské buňky do dvou dceřiných buněk. Samotný buněčný cyklus probíhá ve čtyřech navazujících fázích (obr. 1.9), v jejichž průběhu jsou řešeny specifické úkony nezbytné pro vznik dvou dceřiných buněk z buňky mateřské. Jednotlivé fáze buněčného cyklu se podílejí různou měrou na maligní transformaci:

- **G1 fáze:** Vstup do buněčného cyklu, který je integrací promitotické a antimitotické signalizace. Při převaze promitotické situace dojde k překonání hlavního kontrolního bodu buněčného cyklu v G1 fázi a buňka iniciuje přípravu pro replikaci DNA. G1 fáze a její regulace má zcela rozhodující vliv na mitogenezi. Proto se na její ovlivnění soustředí většina proonkogenních událostí a také farmakoterapeutických zásahů.
- **S fáze:** Probíhá replikace DNA a syntéza intracelulárních organel a komponent pro rozdělení buňky na dvě dceřiné. S fáze musí probíhat i v nádorových buňkách. Její výrazné poruchy učiní i nádorovou buňku neživotaschopnou.
- **G2 fáze:** Probíhá postreplikační kontrola kvality a integrity DNA s vysokou aktivitou DNA reparační. Probíhá příprava na rozdělení buňky v mitóze, ke které dělicí se buňka směřuje po překonání kontrolního bodu v G2 fázi. Porucha regulace restriční

bodů v G2 fázi má významný proonkogenní potenciál se vznikem hypermutantního fenotypu.

- **M fáze:** Mitóza je nejkratší, ale velmi dynamickou částí buněčného cyklu, v jejímž průběhu nastává symetrické rozdělení genetického materiálu a buněčných komponent do dceřiných buněk. Jejich oddělením (cytokineze) buněčný cyklus v buňkách fyziologických tkání končí.

Poruchy buněčného cyklu v nádorových buňkách se vyskytují nenáhodně. Pro zachování integrity buněk, včetně nádorových, je nezbytné, aby buněčný cyklus mechanicky probíhal patřičným způsobem, jinak by vedl k fatálnímu selhání buněčné reprodukce. Poruchy buněčného cyklu v rámci tumorogeneze se tak týkají především snížení prahu pro vstup do buněčného cyklu, tolerance přítomnosti poškození DNA a poruch signálů pro „ukončení“ buněčného cyklu, což se ve výsledku projeví hyperproliferaací.²⁸⁾

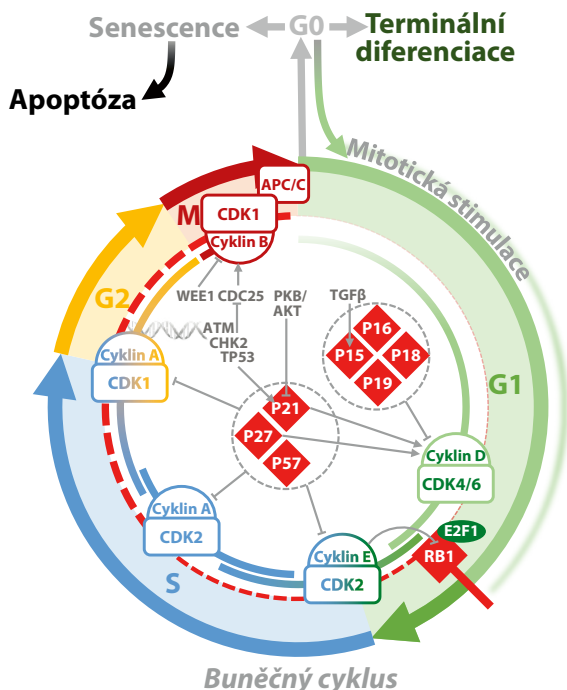
Průběh buněčného cyklu je fyziologicky ovlivněn extracelulární i intracelulární signalizací. Integrace těchto signálních dějů probíhá v tzv. **kontrolních (restrikčních) bodech**. Hlavním kontrolním bodem buněčného cyklu je **restrikční bod v G1 fázi** (ovládaný RB1 proteinem), regulovaný promitotickou a antimitotickou signalizací, po jehož překonání není zástava buněčného cyklu za

fyziologických okolností možná a buněčný cyklus dále probíhá bez významného ovlivnění extracelulárními signálními vlivy. Restrikční bod v G1 fázi je tedy jakýmsi binárním přepínačem, který mnohovrstevné a košaté nadřazené signalizace přeměňuje na signál o zahájení nebo naopak zastavení buněčného dělení. **Kontrolní bod v G2 fázi** spočívá především v integraci intracelulárních podnětů a dominantní úlohu sehrává integrita DNA. Za fyziologických okolností umožňuje rozdělení buňky, která úspěšně a úplně replikovala DNA v S fázi.

V rámci tumorogeneze je aberantně zvýšena aktivita faktorů stimulujících buněčný cyklus (kódovaných onkogeny), a naopak, patologické defekty nacházíme u mechanismů, které průběh buněčného cyklu inhibují (kódovaných tumor supresorovými geny). Prakticky u všech nádorových buněk se setkáváme s funkční poruchou regulace buněčného cyklu v jeho kontrolních bodech. Protože regulace vstupu do buněčného cyklu je úzce spojena i s diferenciací buněk (aktivace diferenciálních dějů mitotickou aktivitu buněk solidních tkání inhibuje), dochází v rámci tumorogeneze i k mnoha změnám v diferenciálních signálních drahách.

Cykliny a cyklin-dependentní kinázy (CDK)

Základními molekulami regulujícími buněčný cyklus jsou **cyklin-dependentní kinázy (CDK)**. Katalytická



Obr. 1.9 Přehled průběhu buněčného cyklu a jeho regulace.

Postupný průběh buněčného cyklu je stimulován komplexy cyklinů a cyklin-dependentních kináz (CDK), jejichž aktivitu negativně ovlivňují jejich inhibitory působící na všechny komplexy cyklinů CDK (P21, P27, a P57) nebo jen na komplex cyklinu D–CDK4/6 (P16, P15, P18, P19). Aktivita a exprese inhibitorů je ovlivněna řadou faktorů. Zahájení buněčného cyklu vyžaduje inaktivaci RB1 proteinu, který je fosforylován cyklinem E–CDK2 a následně i dalšími komplexy cyklinů–CDK (červená čárkovaná čára). Vstup z G2 fáze do mitózy je kontrolován restrikčním bodem v G2 fázi. Zatímco první polovinu mitózy kontroluje aktivita cyklinu B–CDK1, její druhá fáze je regulována pomocí APC/C komplexu (*anaphase promoting complex/cyclosome*) řídícího segregaci chromátid do tvořících se dceřiných buněk a rozdělení mateřské buňky (cytokineze). Po dokončení buněčného cyklu se rozdělené buňky dostávají do G0 fáze a jejich další osud spočívá v aktivitě mitotických či diferenciálních faktorů. Buňky terminálně diferencované tkání si zachovávají dlouhodobou viabilitu, ale ztrácí schopnost aktivovat buněčný cyklus. Tuto schopnost nemají ani buňky aktivující senescenci, které však rychle spějí k zániku aktivací apoptózy.

(serin/threonin kinázová) aktivita (přenos terminální fosfátové skupiny z ATP na serinový nebo threoninový zbytek cílových proteinů) závisí na přítomnosti jejich regulačních podjednotek, které se nazývají **cykliny**, se kterými tvoří heteromerní **komplexy cyklinů–CDK**. CDK tvoří skupinu více než 20 kináz. Pouze čtyři (CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6) slouží primárně pro regulaci buněčného cyklu (tab. 1.5). Cyklin H–CDK7 vytváří komplex cyklin aktivační kinázy (CAK), aktivující vzniklé komplexy cyklinů–CDK v rámci buněčného cyklu.

V průběhu buněčného cyklu dochází k významným změnám přítomnosti cyklinů jako regulačních podjednotek CDK. Exprese genů pro cykliny je v průběhu buněčného cyklu přesně řízena, podobně jako degradace

jejich proteinových produktů cestou ubiquitinylace a následné proteazomální degradace. Po navázání cyklinu na CDK vyžadují komplexy cyklinů–CDK další aktivaci pro nabytí plné kinázové aktivity. Aktivace spočívá ve fosforylaci katalytické podjednotky CDK pomocí cyklin aktivační kinázy (CAK; cyklin H–CDK7), která ovlivňuje konformaci kinázové domény CDK v oblasti tzv. T-kličky. Ovlivnění aktivity komplexů cyklinů a CDK fosforylací/defosforylací zprostředkovanou kinázami/fosfatázami má zásadní vliv na regulaci buněčného cyklu (fosforylace threoninu v oblasti tzv. T-kličky katalytického centra CDK1, zprostředkovaná CAK, zvyšuje její kinázovou aktivitu, zatímco fosforylace threoninu 14 a tyrosinu 15 CDK1, katalyzovaná kinázou WEE1 [obr. 1.12], má účinek inhibiční, který je až následně eliminován fosfatázou

Tab. 1.5 Přehled komplexů cyklinů a cyklin-dependentních kináz (CDK) s charakterizovanou funkcí. Hlavní komplexy dominantně řídící postup buněčným cyklem jsou uvedeny tučně.

Komplex cyklinu–CDK		Základní funkce
Katalytická podjednotka	Regulační podjednotka	
CDK1	cyklin A	regulace G2 fáze
CDK1	cyklin B	vstup do mitózy, regulace profáze a metafáze
CDK2	cyklin E	přechod G1–S
CDK2	cyklin A	regulace S fáze
CDK3	cyklin C	přechod z G0 do G1 fáze v některých tkáních (fibroblasty, hematopoetické progenitory)
CDK4	cyklin D	regulace G1 – zahájení buněčného cyklu; cíl protinádorové léčby (CDK4/6 inhibitory)
CDK5	P35	atypická CDK, není stimulována cyklinem, ale proteinem P35 (nebo P39); alternativa CDK2 v nervovém systému; fosforylace Tau proteinů
CDK6	cyklin D	regulace G1 – zahájení buněčného cyklu; cíl protinádorové léčby (CDK4/6 inhibitory)
CDK7	cyklin H	cyklin aktivační kináza (CAK), regulace transkripce; cíl protinádorové léčby (samuraciklib)
CDK8	cyklin C	regulace transkripce; potenciální cíl protinádorové léčby
CDK9	cyklin T	regulace transkripce; cíl protinádorové léčby (alvocidib)
CDK10	cyklin L/M	kontrola přechodu G2–M; exprese v plně maturovaných buňkách; tumor supresorová funkce?
CDK11	cyklin L/M	regulace translace
CDK12	cyklin K	regulace transkripce / regulace sestřihu pre-mRNA?; tumor supresorová funkce?
CDK13	cyklin K	regulace transkripce / regulace sestřihu pre-mRNA?
CDK14	cyklin Y	regulace signalizace WNT dráhy

Pozn.: Skupiny CDK14–20 jsou charakterizovány doposud málo a jejich význam v kancerogenezi není plně objasněn (jednotlivé studie však naznačují, že se podílejí na progresi různých epitelových nádorů). Patrně se účastní řady fosforylací ovlivňujících signální děje v buňce (např. regulace WNT dráhy komplexem CDK14–cyklin Y). Komplexy cyklinů–CDK zajišťující regulaci transkripce fosforylují C-koncovou doménu (CTD) DNA-dependentní RNA polymerázy II, čímž aktivují zahájení transkripce. **CDK12** se specificky podílí na regulaci transkripce pouze několika málo genů, které však kódují důležité DNA reparační proteiny, včetně BRCA1, ATM, ATR, FANCI a FANCD2. Mutace v *CDK12* byly nadto identifikovány u přibližně u 3 % karcinomů ovaria a přítomnost mutace v *CDK12* u pacientek léčených PARPi významně zvyšovala celkové přežití.

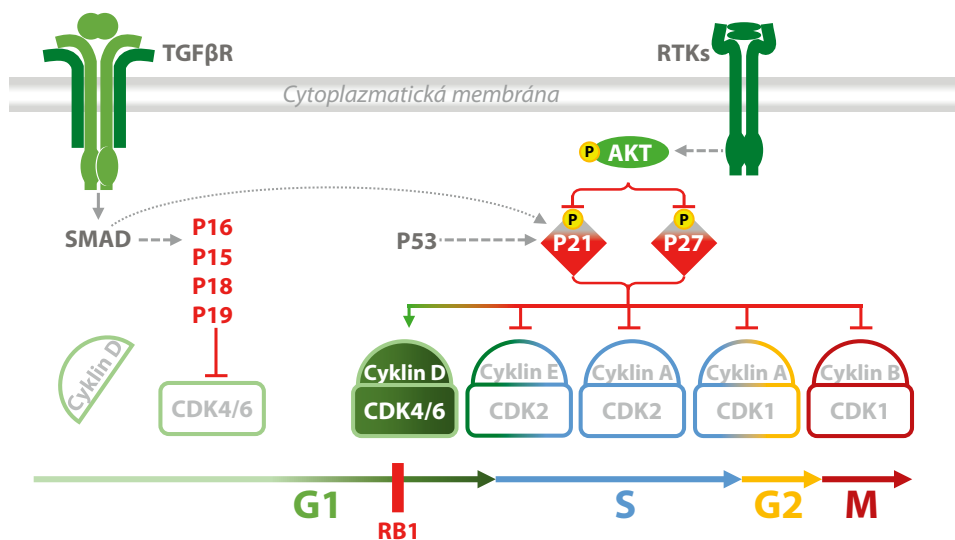
CDC25). Cykliny se podílejí na rozpoznávání cílových substrátů fosforylovaných komplexů cyklinů–CDK. Substráty těchto komplexů jsou stovky proteinů podílejících se na řízení buněčného cyklu, replikaci a reparaci genomové DNA a růstu buňky v průběhu buněčného cyklu. Řízená exprese cyklinů určuje aktivitu jejich komplexů s CDK v přesně vymezených fázích buněčného cyklu a zajišťuje jednosměrný posun biochemických událostí směrem k rozdělení buňky.

Negativní regulátory komplexů cyklinů–CDK

Negativní regulaci buněčného cyklu na úrovni inhibice komplexů cyklinů–CDK zajišťují **CDK inhibitory**. Tyto důležité tumor supresorové proteiny patří do dvou funkčních skupin. První skupina zahrnuje P16^{INK4A}/CDKN2A, P15^{INK4B}/CDKN2B*, P18^{INK4C}/CDKN2C a P19^{INK4D}/CDKN2D, které jsou označovány jako tzv. **INK4 (inhibitory CDK4)**. Všechny INK4 kompe-

tuji o vazbu s cykliny skupiny D na katalytické podjednotky CDK4 nebo CDK6. Vznik komplexu cyklinu D–CDK4/6 je přitom podmínkou překonání restriktivního bodu v G1 fázi. INK4 proteiny tedy zastavují buněčný cyklus ještě před překonáním hlavního restriktivního bodu (obr. 1.9 a 1.10).

Druhá skupina **CKI** (rodina CIP/KIP, *CDK-interacting protein / kinase inhibitory protein*) obsahuje P21^{WAF1/CIP1}/CDKN1A, P27^{KIP1}/CDKN1B, P57^{KIP2}/CDKN1C, které mohou asociovat se všemi již zformovanými komplexy cyklinů–CDK. Výkonně inhibují především komplexy cyklinů E–CDK2, cyklinů A–CDK2, cyklinů A–CDK1 a cyklinů B–CDK1. Slouží tedy především k zástavě buněčného cyklu po překonání restriktivního bodu v G1 fázi. V nedělicích se buňkách je klidová koncentrace P27^{KIP1} relativně vysoká s tendencí se snižovat při zahájení buněčného cyklu v průběhu G1 fáze. Opačný trend lze pozorovat u intracelulární koncentrace



Obr. 1.10 Aktivita inhibitorů komplexů cyklinů–CDK. Skupina INK4 (P16, P15, P18, P19) se váže na CDK4/6, čímž interferuje s vazbou cyklinu D. Brání tak aktivaci CDK4/6 nutné pro překonání hlavního restriktivního bodu, a tím inhibuje buněčný cyklus po průchodu restriktivním bodem v G1 fázi (RB). Proteiny P21, P27 (a P57) jsou schopny inhibovat již vytvořené komplexy cyklinů–CDK. Exprese proteinů INK4 je aktivována transkripčními faktory SMAD fosforylovanými aktivovaným receptorem TGFβ, zatímco expresi P21 indukuje transkripční faktor P53 po poškození genomové DNA, čímž se podílí na regulaci kontrolního bodu G2 fáze. Exprese P21 je účinky aktivovaného TGFβR ovlivněna pouze slabě, což vysvětluje, proč TGFβ nemůže výrazně ovlivnit buněčný cyklus po překonání restriktivního bodu v G1 fázi. P21 stimuluje v průběhu G1 fáze sestavování komplexu cyklinu D–CDK4/6. Aktivace PKB/AKT fosforyluje P21 a P27, které se ve fosforylované podobě nemohou translokovat do buněčného jádra a podílet se na regulaci buněčného cyklu.

AKT – AKT kináze (též PKB); **CDK** – cyclin-dependent kinase; **P16/P15/P18/P19** – protein P16(INK4A)/P15(INK4B)/P18(INK4C)/P19(INK4D); **P53** – protein P53; **RB1** – retinoblastomový gen; **RTKs** – receptor tyrosin kinázy; **SMAD** – SMA (*C. elegans*) and mothers against decapentaplegic (*drosophila*) homolog; **TGFβR** – receptor pro TGFβ; **WEE1** – WEE1 kináze

* Geny *CDKN2A* a *CDKN2B* se nacházejí ve společném genomovém lokusu (9P21; INK4/ARF lokus) a kódují tři (!) proteinové produkty. Kromě zmíněných CKI P16^{INK4A}/CDKN2A a P15^{INK4B}/CDKN2B vzniká použitím alternativního transkripčního počátku *CDKN2A* protein P14^{ARF} (*alternative reading frame*), který inhibuje MDM2 pro aktivaci P53 (viz kap. 1.3.3).

P21^{WAF1/CIP1} vzrůstající v G1 fázi vlivem mitotické stimulace. Na regulaci exprese CKI se podílí řada faktorů. Exprese P15^{INK4B} a P16^{INK4A} je ovlivněna aktivitou TGFβR a regulace exprese P21^{WAF1/CIP1} je po poškození DNA stimulována účinkem P53 (obr. 1.10).

Průběh buněčného cyklu a překonání

G1 restriční bodu

V úvodní části G1 fáze buněčného cyklu dochází vlivem zvýšené mitogenní stimulace k zahájení syntézy **cyklinů D**. Skupinu těchto cyklinů tvoří tři homologní proteiny (D1, D2 a D3), které se se srovnatelnou afinitou mohou vázat na CDK4 nebo CDK6. Všechny cykliny D mají rovněž stejnou substrátovou specifickou v komplexu s CDK4/6. Odlišná je však regulace genů pro jednotlivé cykliny D (*CCND1*, *CCND2* a *CCND3*), které obsahují různé uspořádané promotory obsahující vazebná místa rozpoznávaná různými transkripčními faktory. To umožňuje, aby exprese cyklinů D byla výsledkem aktivace různých cest mitotické stimulace aktivované odlišně v různých tkáních (tab. 1.6).

V rámci buněčného cyklu se exprimuje řada velmi specifických genů (například cykliny) a rozsáhlé sady genů je nezbytné exprimovat za různých kvalitativních i kvantitativních podmínek. Tyto úkoly vyžadují přítomnost specifických transkripčních faktorů, které působí jako transkripční aktivátory (zvyšují transaktivaci pří-

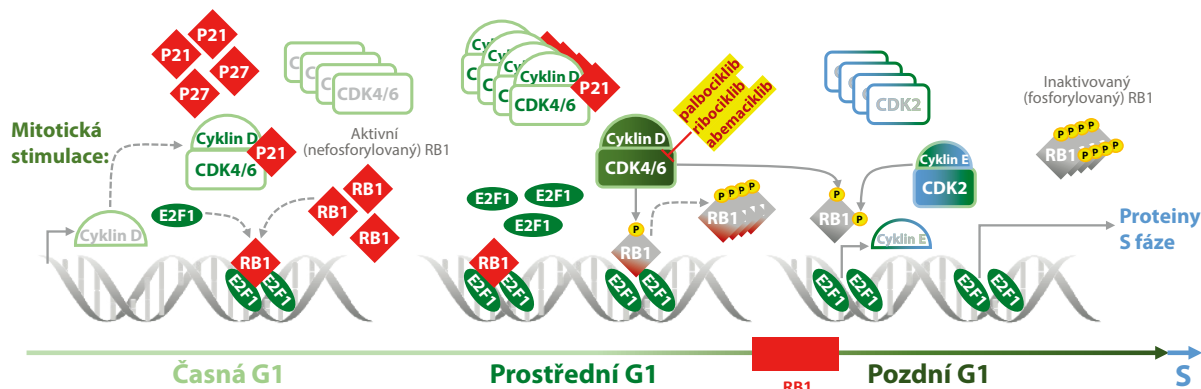
slušného promotoru, a tím zvyšují míru genové exprese, tedy transkripce příslušného genu), nebo represory (vazbou na promotor brání jeho aktivaci). Důležitými transkripčními faktory pro regulaci exprese proteinů podílejících se na řízení a průběhu buněčného cyklu jsou **transkripční faktory z rodiny E2F**, ve které se vyskytují jak aktivátory (E2F1, E2F2, E2F3a), tak represory (E2F3b, E2F4, E2F5) genové exprese.³¹⁾ Aktivátory z E2F rodiny transaktivují geny pro cykliny E a další geny kódující proteiny účastnící se replikace DNA a růstu buňky v S fázi.

V časně **G1 fázi** se v buňce nachází značná koncentrace inhibitorů P21 a P27, které zde napomáhají asociaci cyklinů D s CDK4/6 (obr. 1.11). Důležitým substrátem kinázové aktivity komplexů cyklinů D–CDK4/6 je produkt tumor supresorového genu – **RB1 protein** (retinoblastomový protein), který je molekulární podstatou hlavního kontrolního bodu buněčného cyklu – restričního bodu v G1 fázi. RB1 protein je mocný negativní regulátor buněčného cyklu, jehož kanonická funkce spočívá ve vyvazování a tím inhibici řady intracelulárních bílkovin, především transkripčních faktorů z rodiny E2F.³²⁾ RB1 protein je schopen vytvářet komplexy s volnými proteiny E2F, ale i asociovat s E2F navázanými na promotorech v DNA. (V tomto případě RB1 protein interaguje i s histondeacetylázami [HDAC], které deacetylaci histonů v místě promotorů dále snižují aktivaci

Tab. 1.6 Exprese jednotlivých zástupců cyklinů skupiny D je zajištěna různými transkripčními faktory aktivovanými v závislosti na různých signálních drahách^{29, 30)}

Gen pro cyklin D	Transkripční faktor	Receptor zdrojového signálu
<i>CCND1</i>	AP-1 (JUN/FOS)	receptorové tyrosinkinázy HER2/Neu
	SP1	HER2/Neu
	E2F	HER2/Neu
	STAT	cytokinové receptory
	GLI	hedgehog
	NF-κB	RANKL
	TCF/LEF	WNT/β-katenin
<i>CCND2</i>	cAMP	FSH
	MYC	různé mitogeny
	STAT	receptory pro IL-4, IL-7
<i>CCND3</i>	STAT3/5	receptory pro IL-5
	E2A	receptor pro IL-7

FSH – folikulostimulační hormon; **RANKL** – receptor activator of NF-κB ligand



Obr. 1.11 Překonání restričního bodu v G1 fázi buněčného cyklu. Vysvětlení schématu je uvedeno v textu.

CDK – cyclin-dependent kinase; **E2F** – transcription factor E2F1 (alias RBP3 – retinoblastoma-binding protein 3); **P21** – protein P21 (CDKN1A/WAF1); **P27** – protein P27 (CDKN1B/KIP1)

transkripce; viz kap. 1.2 *Poruchy genomu způsobující nádorová onemocnění*.) Dokud není RB1 protein inaktivován fosforylací, váže transkripční faktory E2F, čímž znemožňuje jejich uplatnění v regulaci genové exprese. Pokračující mitotická stimulace ve střední části G1 fáze způsobí kumulaci E2F a rovněž komplexů cyklinu D s CDK4/6, které jsou schopny vyvazovat volné inhibitory P21 a P27. Jakmile se komplex cyklinu D–CDK4/6 objeví v buňce v aktivní podobě, zahájí fosforylaci RB1. Fosforylovaná forma RB1 proteinu ztrácí schopnost vázat E2F1, které se uvolní a iniciují expresi cyklinu E. **Cyklin E–CDK2** komplex dále hyperfosforyluje RB1. Masivní uvolnění transkripčních faktorů E2F v důsledku inhibice RB1 proteinu tak umožní expresi proteinů S fáze (viz obr. 1.11).

Vstup do **S fáze** řídí komplex **cyklinu E–CDK2**, jehož aktivitu následně přebírá cyklin A–CDK1. Smyslem S fáze je replikace (syntéza) genomové DNA a kromě ní i růst buněčných struktur (např. duplikace centriolů jako kotvicích bodů mitotického vřeténka) a organel, aby obě dceřiné buňky byly po rozdělení životaschopné. V rámci replikace podléhá DNA dvoušroubovice dynamickým změnám geometrického uspořádání (topologie), které jsou umožněny díky enzymové aktivitě **topoizomeráz** (povolujících či přitahujících vinutí DNA ve dvoušroubovici)* a **helikáz** (separujících dsDNA na dvě ssDNA vlákna). Topoizomerázy, resp. jejich akti-

vita je ovlivňována **inhibitory topoizomeráz** (TOP1 inhibitory: kamptotecinová analoga – irinotekan a topotekan – a TOP2 inhibitory: doxorubicin a etoposid). Převážná část S fáze je spojena se vznikem a regulací replikačních komplexů, syntézou DNA a regulací DNA reparačních dějů. Zatímco S fáze končí kompletní replikací genomové DNA, reparační pochody pokračují i v následující G2 fázi.

V průběhu **G2 fáze** probíhá kontrola integrity genomové DNA. Při přítomnosti poruch DNA, především dvouřetězcových zlomů nebo perzistujících jednořetězcových úseků DNA značících nedokonalou replikaci genetického materiálu, dochází k aktivaci reparačních enzymů a zástavě buněčného cyklu v **G2 restričním bodu**. Jeho důležitou součástí je kináza **WEE1**, jejíž aktivita zastavuje buněčný cyklus v G2 fázi. Rozpoznání poruch v DNA je umožněno díky proteinu **ATM** (aktivovaném v přítomnosti dvouřetězcových zlomů DNA; viz kap. 1.2, obr. 1.5) a jeho homologu **ATR** (*A-T and Rad3-related*, aktivovaném v přítomnosti perzistujících jednořetězcových úseků DNA; viz obr. 1.12). ATM/ATR kinázy přímo nebo prostřednictvím aktivace kináz **CHK1** a **CHK2** (*checkpoint kinase 1 a 2*, kódované geny *CHEK1* a *CHEK2*) fosforylují řadu proteinů, které se podílejí na zástavě buněčného cyklu a reparaci DNA. Společným substrátovým cílem obou checkpoint kináz je fosforylace inaktivující fosfatázu **CDC25** (obráz. 1.12).

* Rozdělení topoizomeráz: Topoizomerázy I (TOP1), resp. typ IB (v eukaryontních buňkách), štěpí jen jeden řetězec (vlákno) DNA, který po protočení okolo druhého vlákna opět spojí. Tuto aktivitu vykonávají bez přispění ATP. Topoizomerázy II (TOP2), resp. typ IIA (v eukaryontních buňkách, kam patří i DNA gyráza), mění vinutí DNA přerušením, protočením a znovuspojením obou vláken DNA za spotřeby ATP. Inhibice TOP1 tak způsobuje především ssDNA zlomy, zatímco inhibice TOP2 dsDNA zlomy (viz kap. 1.2, obr. 1.3).

Aktivita CDC25C je nezbytná pro aktivaci MPF (cyklin B-CDK1), který znamená zahájení mitózy. Výsledkem aktivace ATM a CHK2 je fosforylace tumor supresorového proteinu P53 (kap. 1.3.3 Protein P53: společné řízení apoptózy, buněčného cyklu a senescence).

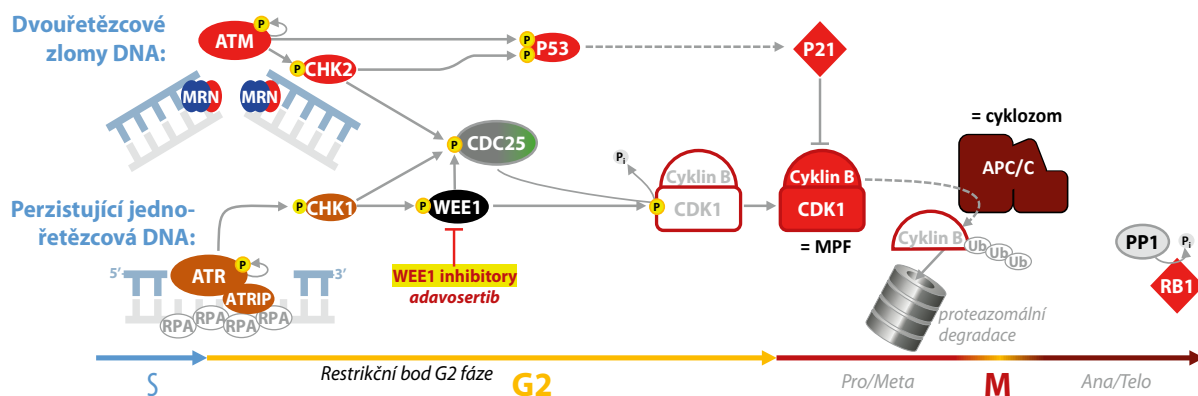
Mitózu (M fázi) můžeme rozdělit do čtyř stadií (profáze, metafáze, anafáze a telofáze) charakterizovaných dynamikou změn a přesuny genetického materiálu. Na biochemické signální úrovni můžeme charakterizovat dvě hlavní části mitózy. První zahrnuje řízení profáze a metafáze, druhá je zodpovědná za regulaci anafáze s telofází. Kritickým signálním bodem je rozhraní mezi metafází a anafází. Řídicími jednotkami obou těchto částí mitózy jsou multiproteinové komplexy. První část (profáze a metafáze) je pod vlivem fosforylační aktivity tzv. MPF (*mitosis promoting factor*), což je aktivní podoba komplexu cyklin B-CDK1. Aktivita MPF je inhibována na přechodu mezi metafází a anafází proteolytickou degradací cyklinu B v proteazomu, která je zprostředkována aktivitou APC/C (*anaphase promoting complex*), nazývaného též **cyklozom** (obr. 1.12).*

Počátek M fáze je charakterizován přesunem komplexu cyklinu B-CDK1 z cytoplazmy do buněčného jádra. Do té doby je komplex cyklinu B-CDK1 zadržován v cytoplazmě díky inhibiční fosforylaci komplexu kinázou WEE1. K translokaci cyklinu B-CDK1 do buněčného jádra dochází v důsledku defosforylace zprostředkované účinkem CDC25C fosfatázy. Aktivní MPF

v průběhu profáze a metafáze fosforyluje řadu substrátů, mezi které patří například komponenty mikrotubulárního aparátu zodpovědné za tvorbu dělicího vřeténka nebo molekuly laminu tvořící jadernou laminu (síťovitou kostru jaderného obalu), po jejichž fosforylaci dochází k rozpadu jaderného obalu a uvolnění kondenzovaných chromozomů v podobě pentlicových útvarů do cytoplazmy. První polovina mitózy končí ukotvením mikrotubulů dělicího vřeténka do oblastí centromer sesterských chromatid všech chromozomů uspořádaných v rovníkové rovině buňky. Dynamika mikrotubulů a jejich zásadní důležitost pro správný průběh mitózy je cílem **antimitotických chemoterapeutik** (např. *vinca* alkaloidy, *taxany*). Pro ukotvení mikrotubulů do oblastí centromery je důležitá fosforylace centromerních proteinů (CENP) aurora kinázami AURKA (STK15) a AURKB (STK12), jejichž aberantní exprese je detekovatelná u řady nádorových onemocnění.

Zahájení druhé poloviny mitózy je podmíněno aktivací zcela odlišného proteinového komplexu APC (*anaphase promoting complex*) s E3-ubikvitinligázovou aktivitou. Jeho hlavní funkcí je degradace inhibitorů anafáze, mezi které patří MPF, pomocí ubikvitinu zprostředkované proteazomální degradace (obr. 1.12).

Rozpadem komplexů kohezinů, proteinů spojujících sesterské chromatidy, dochází k jejich separaci a následná depolymerace vláken dělicích vřetének působí tažení chromatid k pólům buňky. Teprve po segregaci



Obr. 1.12 Restriční bod v G2 fázi buněčného cyklu a přechod do M fáze. Vysvětlení schématu je detailně uvedeno v textu.

ATM – ataxia-telangiectasia mutated; APC/C – anaphase-promoting complex/cyclosome; ATR – ATM and RAD3-related; ATRIP – ATR-interacting protein; CDK – cyclin-dependent kinase; CDC25 – cell division cycle 25 phosphatase; CHK1 – checkpoint kinase 1; CHK2 – checkpoint kinase 2; MRN – MRE11-RAD50-NBN complex; P21 – protein P21; P53 – protein P53; PP1 – protein phosphatase; RPA – replication protein A; Ub – ubiquitin; WEE1 – WEE1 kinase

* APC (*anaphase promoting complex*) je zcela odlišný od APC genu (*adenomatous polyposis coli*), který kóduje regulátor β -kateninu (viz WNT/ β -kateninová signalizace v kap. 1.3.4).

sesterských chromatid a jejich transportu k buněčným pólům může být aktivována závěrečná fáze mitózy – **cytokineze**. K vlastnímu rozdělení buňky dochází za situace, kdy se genetický materiál nachází v polárních oblastech dělicí se buňky již obalen jaderným obalem a zpětně se regeneruje endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. V rámci konečných fází mitózy dochází rovněž k aktivaci specifických fosfatáz (např. PP1, *protein phosphatase 1*), jejichž účinkem je defosforylován protein RB1. Defosforylovaná (aktivní) forma RB1 proteinu rychle asociuje se zbývajícími transkripčními faktory E2F, čímž se podílí na inhibici okamžitého vstupu do dalšího buněčného cyklu v nově vzniklých dceřiných buňkách.

Poruchy buněčného cyklu v tumorogenezi

Pro nádorovou transformaci má klíčový význam vstup do buněčného cyklu, zvýšení mitotické aktivity s deregulací G1 fáze a především deregulace hlavního restričního bodu G1 řízeného RB1 proteinem. Nejčastěji exprimovaným cyklinem skupiny D u somatických (především epitelových) buněk solidních tkání je cyklin D1 a jeho pravděpodobně nejsilnějším induktorem je promitotická stimulace aktivovaná receptory pro růstové faktory (receptorovými tyrosinkinázami, RTK; viz kap. 1.3.4). Proto se u většiny tumorů setkáváme s defekty mitogeneze v ose: růstové faktory → RTK → RAS → cyklin D1 a E / inaktivace CKI → inaktivace RB1 → aktivace E2F → S fáze.

Poruchy mitogenní signalizace signálně transdukčních drah budou shrnuty v dalších kapitolách (zde si dovolueme pouze poznamenat, že všechny proteinové komponenty facilitující přenos signálu v uvedené signální ose jsou produkty onkogenů, zatímco negativní regulátory této dráhy jsou kódovány tumor supresorovými geny). Pro kancerogenezi je rovněž důležitá schopnost deregulace restričního bodu v G2 fázi, který je součástí protinádorové bariéry.

Poruchy exprese cyklinů i CDK či poruchy CKI se vyskytují u mnoha nádorů. Kromě funkční hyperaktivace komplexů cyklinů–CDK časté u karcinomů byla vysoká exprese CDK4/6 z důvodu amplifikace genu (zmnožení jeho kopií v genomu) nebo hyperexprese dokumentována u řady nádorů, u CDK6 včetně lymfomů, leukemií a nádorů CNS, u CDK4 u melanomu, karcinomu prsu, sarkomů a nádorů CNS. Hyperaktivace cyklinu D1 může být způsobena jeho overexpresí, amplifikací genu, polymorfismy, translokací i aberantním sestřihem pre-mRNA (v případě varianty c.723G>A; p.Pro241=; označované jako G870A). Zvýšená exprese cyklinu D1 byla zaznamenána až u 60 % karcinomů

prsu, 40 % kolorektálních karcinomů, 40 % skvamózních nádorů hlavy a krku a 20 % karcinomů prostaty.³³⁾ Podobně lze dokumentovat zvýšenou expresi i ostatních cyklinů a CDK. Vysoký výskyt hyperaktivace komplexů cyklinů D–CDK4/6 pro regulaci vstupu do buněčného cyklu vedl k aplikaci jejich inhibitorů (palbociklib, ribociklib, abemaciklib) v protinádorové léčbě (obr. 1.11). Logickým předpokladem jejich účinnosti je zachování exprese RB1 proteinu v nádorových buňkách. Řada dalších kandidátních látek (např. dinaciklib) je předmětem intenzivního výzkumu.

Ze skupiny CKI se nejběžněji vyskytují somatické inaktivace P16^{INK4A} (nejčastější u karcinomu pankreatu).³⁴⁾ Bývají způsobeny různými mechanismy (bodovými mutacemi, výpadky alel i hypermetylacemi promotoru). Na druhé straně, vysoká exprese P16^{INK4A} je spojena s výskytem *high-grade* prekanceróz a karcinomů děložního hrdla, karcinomů orofaryngu a perianální oblasti podmíněných vysoce rizikovými genotypy papilomavirů (HPV16/18). Molekulární podstata vysoké exprese u buněk infikovaných HPV viry není spolehlivě vysvětlena. Předpokládá se, že exprese virového E7 proteinu inaktivujícího RB1 vyžaduje z ne zcela jasných důvodů inaktivaci CDK4/6, kterou zajišťuje P16^{INK4A}. V tomto konceptu se zcela obrací úloha obou proteinů a CDK4 vystupuje jako tumor supresor, zatímco P16^{INK4A} jako onkogen.³⁵⁾

Inaktivace RB1 proteinu somatickými mutacemi jsou méně časté (25 % sarkomů a uroteliálních karcinomů močového měchýře), než je jeho funkční inaktivace. Ta může být spojena s aktivitou virových onkoproteinů, jako je E7 protein HPV-16, které svou E3-ubikvitinligázovou aktivitou ubikvitinylují RB1 protein pro jeho následnou degradaci v proteazomu (viz kap. 1.2, tab. 1.3).

Vrozené mutace proteinů řídících buněčný cyklus jsou příčinou dědičných nádorových syndromů:

- RB1 – familiární retinoblastom,
- CDK4 – familiární melanom (extrémně vzácné!!!),
- P16^{INK4A}/CDKN2A – familiární melanom a familiární karcinom pankreatu,
- P27^{KIP1}/CDKN1B – mnohočetná endokrinní neoplazie (MEN) typ 4,
- P57^{KIP2}/CDKN1C – Beckwithův–Wiedemannův syndrom (Wilmsův tumor, hepatoblastom, karcinom nadledviny, gonadoblastom).

Regulace obou restričních bodů buněčného cyklu je ovlivňována tumor supresorovým proteinem P53, jehož poruchy se tak promítají i do deregulace buněčného cyklu (viz níže kap. 1.3.3 *Protein P53: společné řízení apoptózy, buněčného cyklu a senescence*).

Růst buněk nádorů s poruchou regulace restričního bodu v G1 fázi je v mnoha případech závislý na kompetenci restričního bodu G2 fáze a kontrolovaném průběhu mitózy. Jejich poruchy mohou způsobit katastrofální genomovou nestabilitu, nakupení genetických aberací a intra-/interchromozomových přestaveb (chromothripsis) způsobující zánik buněk. Průběh mitózy ovlivňují chemoterapeutika cílící na dynamiku mikrotubulů dělicího vřeténka (vřeténkové jedy). Zatímco **vinca alkaloidy** (např. vinkristin a vinblastin) inhibují polymeraci tubulinu, **taxany** (např. paklitaxel a docetaxel) hyperstabilizují formované mikrotubuly a inhibují jejich depolymeraci. Cílená manipulace regulátorů G2 fáze je předmětem intenzivního farmaceutického výzkumu (například adavosertib a další kandidátní inhibitory WEE1 kinázy³⁶⁾ nebo AURKA inhibitory³⁷⁾).

1.3.2 Apoptóza a její poruchy

Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je aktivní forma zániku jednotlivých buněk nebo buněčných populací. Společně s mitózou se apoptóza podílí na remodelaci a obnově tkání a je nezbytným fyziologickým dějem pro udržení tkáňové homeostázy. Snížená schopnost indukce apoptózy je charakteristickou známkou všech nádorových onemocnění a společně s hyperproliferací se podílí na zmnožování nádorových buněk. Vzhledem k tomu, že účinek většiny protinádorových terapií je zprostředkován aktivací apoptózy v nádorových buňkách, odráží schopnost její aktivace do značné míry i senzitivitu nádorových populací k protinádorové léčbě.

Průběh apoptózy

Průběh apoptózy charakterizuje jednotný morfologický obraz, při němž na mikroskopické úrovni postupně dochází ke ztrátě mezibuněčných kontaktů, změnám buněčného jádra a měchýřkovitému „pučení“ cytoplazmatické membrány vyúsťujícímu v konečný rozpad buňky za vzniku apoptotických tělísek.*

Apoptóza vyžaduje přítomnost řady specializovaných výkonných a regulačních molekul zúčastněných na třech úrovních průběhu apoptózy: v iniciační, kontrolní a efektorové fázi. Nejvíce heterogenní je iniciační fáze

apoptózy, v jejímž průběhu vznikají iniciační apoptotické signální komplexy. V kontrolní fázi dochází k integraci proapoptotických a protiapoptotických signálů, které jsou ovlivňovány i dalšími intracelulárními signálními cestami. V případě převahy proapoptotické signalizace vstupuje apoptóza do ireverzibilní efektorové fáze končící rozpadem buňky.

Biochemickou podstatou apoptózy je série regulovaných proteolytických štěpení intracelulárních proteinů, zprostředkovaná výkonnými apoptotickými proteolytickými enzymy – **kaspázami**.

Přestože apoptózu vyvolávají různé podněty, aktivační děje probíhají dvěma hlavními drahami (obr. 1.13):

1. **Extrinzickou dráhou** je zprostředkována likvidace buněk tkání zprostředkovaná cytotoxickými imunitními buňkami, především cytotoxickými T lymfocyty. Extrinzická dráha je zahájena vytvořením apoptotického aktivačního komplexu z receptorů na cytoplazmatické membráně cílové buňky (tzv. death receptorů) stimulovaných specifickými ligandy (*death ligands*) ukotvenými v membráně interagujících imunitních buněk. Extrinzická cesta apoptózy je dominantním způsobem iniciace buněčné smrti u nádorově transformovaných nebo viry napadených buněk. Alternativní cesta extrinzické dráhy je aktivována proteázou **granzym B**, kterou produkují cytotoxické T lymfocyty (CTL) nebo NK buňky.³⁸⁾
2. **Intrinzickou dráhu** aktivuje ireparabilní poškození genomové DNA, významné alterace v regulaci buněčného cyklu nebo insuficientní energetický a substrátový metabolismus buňky. V aktivaci intrinzické dráhy sehrává dominantní roli vznik apoptotických aktivačních komplexů utvářených na povrchu zevní membrány mitochondrií. Rozhodující vliv na indukci těchto apoptotických aktivačních komplexů mají proteiny rodiny BCL2.

Extrinzická a intrinzická cesta aktivace apoptózy vyúsťuje ve společnou **efektorovou (exekutivní) fázi** probíhající za mohutné aktivace kaspáz. **Kaspázy** jsou proteolytické enzymy, které jsou v buňce trvale exprimovány v podobě neaktivních zymogenů – **prokaspáz**. Iniciační kaspázy aktivované proapoptotickými komplexy

* Na rozdíl od nekrózy, při které dochází k edematóznímu zduření buňky se vznikem defektů v cytoplazmatické membráně, kterými se do intersticiálního prostoru dostává cytoplazmatický obsah buňky indukující zánětlivou odpověď, při prosté apoptóze jsou apoptotická tělíska (fragmenty zaniknuvší buňky obalené cytoplazmatickou membránou) endocytována okolními buňkami tkáně a nezpůsobují rozvoj imunitní reakce. Při rozsáhlé apoptóze (např. vlivem ionizujícího záření) však může dojít k překročení fagocytární kapacity, apoptotická tělíska se rozpadají *in situ* a indukují zánět.

v úvodní části apoptózy (kaspáza 8, 9) následně aktivují exekutivní kaspázy (např. kaspáza 3, 6, 7) hydrolyticky štěpící strukturní a regulační buněčné proteiny. Na konci apoptózy je genomová DNA štěpena endonukleázou **CAD** (*caspase-activated DNase*).

Extrinzická cesta aktivace apoptózy

Extrinzická cesta aktivace apoptózy slouží pro iniciaci buněčné sebeustrukce zprostředkované efektorovými buňkami imunitního systému. Tyto buňky (CTL nebo NK buňky) exprimují na svém povrchu membránově vázané death ligandy. Zatímco death ligandy jsou molekuly exprimované pouze efektorovými buňkami imunitního systému, jejich receptory (death receptory) jsou trvale exprimovány v cytoplazmatické membráně buněk všech tkání (včetně buněk imunitního systému). **Death receptory** patří do skupiny receptorů pro tumor nekrotizující faktor (**TNFR**). Spolu s ním je **FAS** (**CD95** nebo též **APO1**) hlavním proapoptotickým zástupcem rodiny death receptorů (tab. 1.7).

Po stimulaci death ligandy asociují death receptory na cytoplazmatické membráně cílových buněk za vzniku trimerních komplexů. Trimerizace death recepto-

rů indukuje změnu konformace trimerního komplexu v jeho intracelulární části obsahující tzv. death domény (**DD**) sloužící pro interakci s dalšími proteiny v signalizaci (obr. 1.13). Ta může být poměrně pestrá a závisí na přítomnosti různých adaptorových molekul asociujících s aktivovanými receptory.*

Navázáním iniciační prokaspázy 8 vzniká plně funkční apoptotický aktivační komplex **DISC** (*death inducing signaling complex*). Lokalizace prokaspázy 8 v DISC komplexu umožňuje její autokatalytickou aktivaci za vzniku aktivní, volné kaspázy 8, jejímž hlavním substrátem je prokaspáza 3 v efektorové části apoptózy. Efektorová část je společnou exekutivní fází apoptózy, do které ústí intrinzická i extrinzická dráha.

Intrinzická cesta aktivace apoptózy

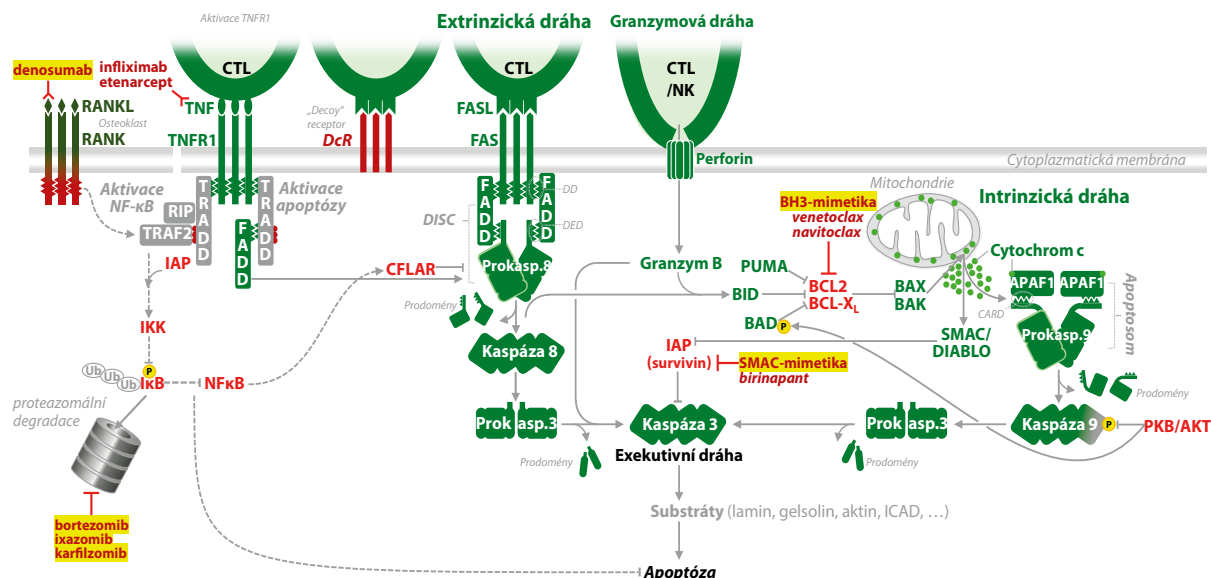
Aktivací intrinzické cesty apoptózy zanikají buňky poškozené, staré nebo nepotřebné, u kterých se funkční porucha projeví porušením transmembránového potenciálu mitochondrií umožňujícího tvorbou ATP. V buňkách s výraznou alterací genomové DNA (v důsledku jejího poškození fyzikálními a chemickými vlivy, včetně chemoterapie nebo radioterapie) nebo při ireverzibilním

Tab. 1.7 Vybrané death receptory a jejich ligandy s alternativními názvy

Death receptor (alternativní názvy)	Jeho ligand (alternativní názvy)
FAS (TNFRSF6, CD95, APO1, DR2)	FASLG (FASL, CD95L, TNFSF6, CD178)
TNFRSF1A (TNFR1, DR1)	TNF (TNFA, TNF-α)
TNFRSF25 (DR3, TNFR25, APO3, TNFRSF12, LARD, TRAMP)	TNFSF12 (APO3L, TWEAK)
TNFRSF10A (DR4, APO2, TRAILR1)	TNFSF10 (TRAIL, APO2L)
TNFRSF10B (DR5, TRAILR2, KILLER, TRICK2)	TNFSF10 (TRAIL, APO2L)
Decoy receptory postrádající DD (alternativní názvy)	
TNFRSF10C (DCR1, TRID, TRAILR3)	TNFSF10 (TRAIL, APO2L)
TNFRSF10D (DCR2, TRAILR4, TRUND)	TNFSF10 (TRAIL, APO2L)
TNFRSF6B (DCR3, TR6)	TNFSF12 (APO3L, TWEAK)
Další receptory z rodiny TNF	
TNFSF11 (RANK)	RANKL (TRANCE, OPGL)

Pozn.: Tzv. **decoy receptory** postrádají DD a při expresi slouží pro kompetitivní inhibici death receptorů, se kterými soutěží o death ligandy při aktivaci extrinzické dráhy apoptózy.
DCR – decoy receptor; **DD** – death domain; **DR** – death receptor; **LARD** – lymphocyte-associated receptor of death; **OPGL** – osteoprotegerin ligand; **RANK** – receptor activator of NF-κB; **RANKL** – RANK ligand; **TNFSF** – tumor necrosis factor ligand superfamily member; **TNFRSF** – tumor necrosis factor receptor superfamily member; **TRAIL** – TNF-related apoptosis-inducing ligand; **TRAMP** – TNF-receptor-related apoptosis-mediated protein; **TRANCE** – TNF-related activation-induced cytokine; **TRICK** – TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) receptor inducer of cell killing 2; **TRID** – TRAIL receptor without an intracellular domain; **TRUND** – TRAIL receptor with a truncated death domain; **TWEAK** – TNF-related weak inducer of apoptosis

* Adaptorové molekuly (adapty) receptorových komplexů slouží jako vazebná místa zprostředkovávající interakci různých intracelulárních proteinů s aktivovanými receptory. K tomuto účelu jsou vybaveny různými protein–proteinovými interakčními moduly – v případě death receptorů jsou těmito interakčními moduly DD motivy.



Obr. 1.13 Schematické znázornění aktivace apoptózy. Na počátku aktivace apoptózy vznikají proapoptotické signální komplexy. Aktivace **extrinzické dráhy** vyžaduje trimerizaci death receptorů (**FAS**) stimulovanou přítomností jejich ligandů (**FASL**) na membráně CTL. Na trimerizovaný receptorový komplex se pomocí DD váží adaptorové molekuly **FADD**, se kterými prostřednictvím DED asociují molekuly iniciačních kaspáz ve formě prokaspáz (**prokaspáza 8** nebo **prokaspáza 10**). Vstupem prokaspáz je dokončeno vytvoření **DISC** komplexu. Prokaspázy se autokatalyticky intramolekulárně štěpí, čímž dochází k jejich disociaci z DISC (při štěpení prokaspáz dochází k oddělení tzv. prodomény, obsahujících DED interagujících s DED v adaptorové molekule FADD). Zbýlý polypeptidový řetězec prokaspázy je rozštěpen na velkou a malou podjednotku, které dohromady tvoří polovinu plně proteolyticky aktivní kaspázy. Volná kaspáza 8 štěpí exekutivní **prokaspázy 3** v ireverzibilní části apoptózy za vzniku proteolyticky aktivní kaspázy 3. **Decoy receptor** (DcR) postrádající aktivaci cytoplazmatickou oblast s DD slouží pro negativní regulaci aktivace death receptorů. **Granzym B** (proteáza produkovaná CTL/NK buňkami) umožňuje aktivaci apoptózy bez účasti death receptorů. Granzym B proniká do cílové buňky po destabilizaci cytoplazmatické membrány póry tvořenými **perforinem** (produkovanými rovněž CTL/NK buňkami) a proteolyticky aktivuje exekutivní kaspázy. Štěpením proteinu **BID** (kaspázou 8 nebo granzymem B) dochází k aktivaci intrinzické dráhy, což zesiluje apoptotický signál zprostředkovaný imunitními buňkami. **Intrinzická dráha** je dominantně závislá na aktivitě proteinů BCL2 rodiny. Při převaze proapoptotických **BCL2** proteinů (např. **BAX**, **BAK**) dojde k destabilizaci zevní mitochondriální membrány, která se stane propustnou pro **cytochrom c**. Destabilizační účinek BAX/BAK na mitochondriální membránu antagonizují antiapoptotické proteiny **BCL2/BCL-X_L**. Antagonisté proapoptotických BCL2 zástupců jsou proteiny z rodiny **BH3-only** (např. **BID**, **BAD**). Uvolněný cytochrom c je rozpoznáván **APAF1**, jenž interaguje pomocí CARD domén s **prokaspázou 9** za vzniku **apoptozomu**. V tomto proteinovém komplexu se prokaspáza 9 autokatalyticky aktivuje za vzniku aktivní kaspázy 9 (za odštěpení prodomény obsahující CARD a rozdělením polypeptidu na velkou a malou podjednotku, podobně jako vzniká kaspáza 8 v extrinzické dráze). Kaspáza 9 opouští apoptozom a aktivuje exekutivní **kaspázu 3**. Substráty exekutivních kaspáz v ireverzibilní části apoptózy jsou strukturní a regulační intracelulární proteiny, jejichž degradace vede k zániku buněk a jejich rozpadu na apoptotická tělíska. **Regulace apoptózy** probíhá na řadě úrovní. V extrinzické cestě apoptózy je aktivace prokaspázy 9 inhibována její kompeticí s **CFLAR** ve vazbě do DISC. Spojení mezi extrinzickou a intrinzickou cestou apoptózy zprostředkovává BID. Aktivní kaspázy jsou inhibovány **IAP proteiny**, jejichž inhibici činí protein **SMAC/DIABLO** uvolňovaný společně s cytochromem c z mitochondrie. Na regulaci apoptózy se podílí i antiapoptotická signalizace **PKB/AKT**, která fosforylaci inaktivuje kaspázu 9 (ale také BAD nebo IκB).

Aktivace TNFR1 (vlevo) svým ligandem (TNF, nazývaným též TNFα) může stimulovat nejen apoptózu, ale i další signální dráhy, jako je naznačená aktivace transkripčního faktoru **NF-κB** po navázání alternativních adaptorových molekul (**TRAF2** a **RIP**). Navázání TRAF2 a RIP způsobuje aktivaci **IKK** fosforylující **IκB**, inhibitor transkripčního faktoru NF-κB. Nefosforylovaný IκB zadržuje NF-κB v cytoplasmě. Fosforylace IκB způsobuje jeho rychlou ubiquitinylaci a degradaci v proteozomu. Uvolněný NF-κB se translokuje do buněčného jádra, kde transaktivuje transkripci genů, jejichž proteinové produkty mají často antiapoptotický účinek, jako je např. **CFLAR (FLIP)** kompetující s navázáním prokaspázy 8 do aktivačního komplexu DISC. Aberantně zvýšená aktivita TNFα se podílí na rozvoji řady autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, psoriáza, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida) léčených TNF protilátkami (etanercept). Aktivace transkripčního faktoru NF-κB je dominantní signální úloha pro některé zástupce rodiny TNFR, jako je například **RANK** receptor, stimulující aktivitu osteoklastů v kostních metastázách. Specifická protilátka (denosumab) proti RANKL inhibuje jeho

interakci s RANK, čímž inhibuje osteolýzu. Inhibice proteolytické aktivity proteazomu se podílí na snížení aberantní aktivity NF- κ B, která bývá přítomna především u různých hematopoetických nádorů (mnohočetný myelom).

APAF1 – apoptotic protease activating factor 1; **BAD** – BCL2 antagonist of cell death; **BID** – BH3-interacting domain death agonist; **CARD** – caspase recruitment domain; **CFLAR** – CASP8-and FADD-like apoptosis regulator (též FLIP, CASPER, FLAME, CSH, MRIT); **CTL** – cytotoxický T lymfocyt; **DD** – death domain; **DED** – death effector domain; **DIABLO** – direct IAP binding protein of low pl (též SMAC); **DISC** – death-inducing signaling complex; **FADD** – FAS-associated via death domain; **IAP** – inhibitors of apoptosis; **ICAD** – inhibitor of caspase-activated DNase; **I κ B** – inhibitor of NF κ B; **IKK** – I κ B kinase; **NF κ B** – nuclear factor κ B; **NK** – natural killer; **PKB/AKT** – proteinkináza B/AKT; **PUMA** – P53-upregulated modulator of apoptosis (nazývaný též BBC3); **RANK** – receptor activator of NF- κ B; **RANKL** – RANK ligand; **RIP** – receptor-interacting protein (též RIPK1); **SMAC** – second mitochondria-derived activator of caspase; **TNF** – tumor necrosis factor; **TNFR1** – tumor necrosis factor receptor 1; **TRADD** – TNFR1-associated death domain protein; **TRAF2** – TNFR1-associated factor 2

selhání replikace genomové DNA je aktivace intrinzičké cesty apoptózy indukována aktivní permeabilizací zevní mitochondriální membrány. Vznikajícími otvory v zevní mitochondriální membráně dochází k uvolnění **cytochromu c** (malého hem obsahujícího proteinu přítomného na vnitřní mitochondriální membráně, kde slouží k přenosu elektronů v dýchacím řetězci). Po uvolnění do cytoplazmy (kde se za normálních okolností nevyskytuje) se cytochrom c stává silným aktivátorem apoptózy. Hlavním regulátorem uvolňování cytochromu c z mitochondrie je skupina bílkovin patřící do rozsáhlé (> 20 zástupců) **rodiny proteinu BCL2**.³⁹⁾ Jednotliví zástupci BCL2 proteinů patří buď mezi inhibitory (BCL2, BCL-X_L, BCL-W, MCL1, A1), nebo aktivátory (BAX, BAK, BOK) apoptózy. Významnou podskupinu aktivátorů pak tvoří proteiny ze skupiny tzv. BH3-only (BAD, BIM, BID, PUMA, NOXA, BMF). Charakteristickou vlastností všech členů BCL2 rodiny je schopnost vytvářet vzájemně homodimery i heterodimery, které asociují se zevní mitochondriální membránou.*

Asociace proapoptotických zástupců (BAX, BAD) způsobuje tvorbu pórů v zevní mitochondriální membráně, jimiž cytochrom c uniká z mitochondrie do cytoplazmy. Tvorba pórů proteinů je inhibována anti-apoptotickými BCL2 proteiny heterodimerizujícími s BAX a BAD. Inhibiční heterodimerizaci antagonizují BH3-only proapoptotické BCL2 proteiny (obr. 1.13). Při převaze proapoptotických zástupců BCL2 rodiny dochází k uvolnění cytochromu c, který je v cytoplasmě rychle rozpoznáván molekulami **APAF1** (*apoptotic protease-activating factor 1*). Cytochrom c indukuje změnu konformace APAF1 umožňující navázání **prokaspázy 9** za vzniku komplexu nazývaného **apoptozom**. Apoptozom umožňuje autokatalytickou aktivaci prokaspázy 9 za vzniku aktivní, volné kaspázy 9, jejímž hlavním sub-

strátem je prokaspáza 3 v efektorové části apoptózy (případně další exekutivní kaspázy).

Společná exekutivní část apoptózy

Postupná aktivace prokaspáz aktivními kaspázami indukovanými v úvodní části apoptózy amplifikuje apoptotický signál. Aktivní iniciační kaspázy 8 (a 10) v extrinzičké a 9 v intrinzičké dráze mají překrývající se substrátové cíle (obr. 1.13) – **exekutivní prokaspázu 3** (a také 6 a 7). Substráty exekutivních kaspáz jsou strukturní a funkční intracelulární proteiny nezbytné pro normální existenci buňky. Mezi tyto proteiny patří například aktin (součást cytoskeletu), lamin (součást nukleárního skeletu), proteiny regulující sestřih mRNA (tím dochází k zastavení genové exprese) nebo reparační proteiny (např. PARP1). Na vrcholu exekutivní fáze apoptózy začíná degradace genomové DNA aktivací **endonukleázy CAD**, která hydrolyticky štěpí genomovou DNA.

Jakmile dojde k aktivaci kaspáz v exekutivní části, stává se apoptóza nevratným dějem. Kaspázami štěpené strukturní proteiny způsobí kolaps cytoskeletárního a nukleoskeletárního aparátu, který společně se štěpením genomové DNA vede k fragmentaci buněčného jádra a následně i k rozpadu buňky na apoptotická tělíska. Charakteristické projevy apoptózy jsou tak morfologickým korelátem již pokročilé a ireverzibilní fáze exekutivní části apoptózy.

Regulační proteiny apoptózy

Kontrolní fáze apoptózy se účastní řada proteinů ovlivňujících nejen přímo apoptotickou kaskádu, ale sloužících také pro integraci další intracelulární signalizace do regulace apoptózy (obr. 1.13). Mezi inhibitory aktivace prokaspáz patří např. protein **CFLAR**, který soutěží s prokaspázou 8 o vstup do DISC. Navázáním proteinu

* Na strukturní úrovni charakterizuje příslušnost k BCL2 rodině přítomnost alespoň jedné BCL2 homologní domény (BH1–4) v molekule proteinu. BH domény umožňují řadu funkcí BCL2 proteinů, jako je např. jejich vzájemná dimerizace (pomocí BH3 domén). Proteiny rodiny BCL2 asociují s vnější membránou mitochondrií, i když někteří zástupci (ze skupiny tzv. BH3-only, mající pouze tuto ze všech BH domén) se vyskytují i volně v cytoplasmě. BCL2 proteiny z podskupiny BH3-only jsou apoptózu indukující faktory aktivované na základě řady cest intracelulární signalizace.

CFLAR se prokaspáza nemůže navázat, a tudíž ani aktivovat v DISC.

Přímými inhibitory již aktivovaných kaspáz jsou proteiny ze skupiny **proteinů IAP**, které slouží jako antiproteázy ochraňující buňku před náhodnou aktivací kaspáz (kromě toho se účastní řady dalších pochodů). Jedním z IAP proteinů často zvýšeně exprimovaných u řady nádorů je BIRC5 (*baculovirus IAP repeat-containing protein 5*, nazývaný běžněji **survivin**). Negativním regulátorem IAP je mitochondriální protein **SMAC/DIABLO**, uvolňovaný z mitochondrie při porušení její zevní membrány současně s cytochromem c.

Vzájemné signální propojení mezi extrinzickou drahou apoptózy, zprostředkovanou imunokompetentními buňkami, a intrinzickou drahou umožňuje protein BID. Propojení obou drah je v řadě buněk nutnou podmínkou pro plné rozvinutí apoptózy. Protein BAD je aktivován v důsledku nedostatku růstových faktorů a následně způsobuje inaktivaci BCL-X_L; naopak fosforylace BAD kinázou AKT má na apoptózu inhibiční účinek. Exprese antiapoptotických (BH3-only) proteinů PUMA a NOXA je kontrolována transkripčním faktorem P53 (*viz dále*).

Cílená léčba defektů apoptózy v nádorových buňkách

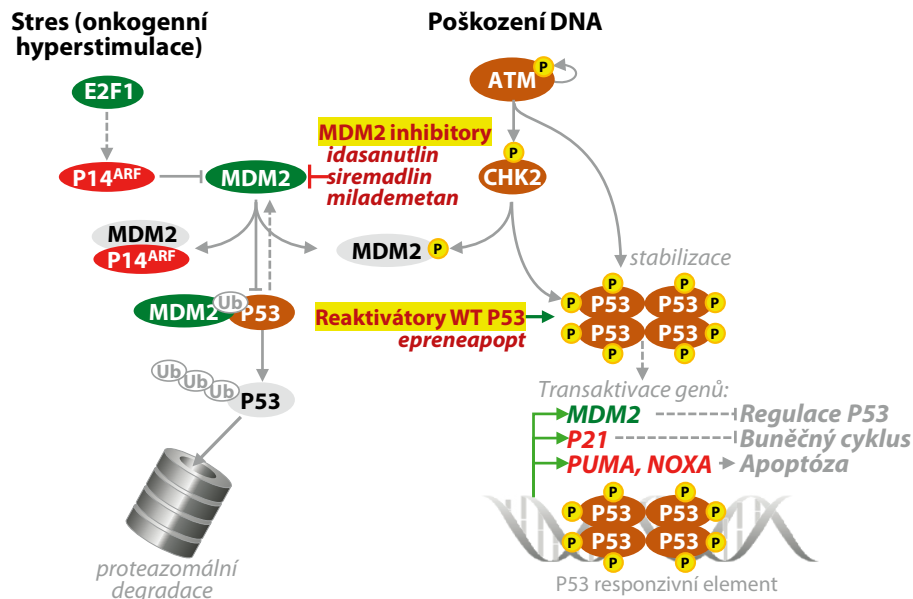
Poškození aktivace apoptotické signalizace je jednou z hlavních charakteristik nádorových buněk. Z podstaty tumorigeneze vznikají defekty apoptózy inaktivací proapoptoticky působících faktorů a hyperaktivací antagonisticky působících inhibitorů apoptózy. Aktivační mutace nebo hyperexprese antiapoptotických onkogenů stejně jako inaktivační mutace tumor supresorových genů kódujících proapoptotické proteiny jsou kandidátními prognostickými (a teranostickými) faktory u řady hematopoetických i solidních nádorů. Na tyto faktory také cílí rozrůstající se skupina (stále spíše experimentálních či v časných stádiích klinického hodnocení) protinádorových terapeutik cílících na jednotlivé molekuly apoptotických drah (*obr. 1.13*). Při poruše aktivace intrinzické dráhy apoptózy (např. při hyperstimulaci exprese proonkogeně působících antiapoptotických regulátorů, jako je BCL2, nebo při snížené expresi proapoptotických proteinů, např. BAX především při vyřazení tumor supresorového proteinu P53) lze uvažovat o použití tzv. **BH3-mimetik** stimulujících aktivitu BH3-only proapoptoticky působících proteinů inhibujících antiapoptotické zástupce BCL2 rodiny.⁴⁰⁾ Zvýšením aktivity proapoptotických proteinů BCL2 rodiny se BH3-mimetika podílejí na aktivaci intrinzické dráhy apoptózy, destabilizaci zevní mitochondriální membrány, uvolnění cytochromu c z mitochondrie a aktivaci apoptozomu.

Atraktivita BH3-mimetik spočívá v několika skutečnostech. BH3-only proteiny jsou malé molekuly s definovanou (specializovanou) interakční doménou sloužící pro inhibici jednotlivých antiapoptotických molekul z rodiny BCL2, což umožňuje připravení i nízkomolekulárních inhibitorů na bázi BH3-only proteinů. Exprese významných zástupců BH3-only proteinů (např. PUMA, NOXA) je významně regulována pomocí tumor supresorového proteinu P53 (*viz níže*), který je mutován či jinak inaktivován téměř v polovině případů všech solidních nádorů. Další slibnou koncepcí je inhibice proteinů ze skupiny IAP pomocí **SMAC-mimetik**.⁴¹⁾ Aberantně zvýšená exprese IAP proteinů (např. survivinu) byla nalezena u mnoha solidních nádorových onemocnění a lymfomů. Ukazuje se, že IAPs mají, kromě zmiňované inhibice kaspáz, řadu dalších funkcí, kterými se podílejí na tumorigenezi (aktivace NF-κB, regulace nádorově specifické zánětlivé odpovědi, podíl na metastatickém potenciálu).⁴²⁾ SMAC-mimetika, založená na struktuře domény SMAC proteinu inhibujícího IAP proteiny, tak mají léčebný potenciál nejen cestou aktivace apoptózy, ale i potlačením metastatického potenciálu a ovlivněním imunitní reakce.

1.3.3 Protein P53: společné řízení apoptózy, buněčného cyklu a senescence

V předchozím textu jsme zmínili, že apoptóza a buněčný cyklus jsou *de facto* dva protipóly tkáňové plasticity. Za normálních fyziologických okolností je nezbytné, aby buňky v tkáních byly trvale schopné přijímat signály regulující jak buněčný cyklus, tak apoptózu. Kromě toho, že jsou oba děje logicky spřažené, k jejich těsnému spojení dochází na úrovni jejich řízení. Po překonání restriktivního bodu v G1 fázi existují za normálních okolností pouze dvě cesty: buď buňka buněčný cyklus úspěšně dokončí a rozdělí se na dvě buňky dceřiné, nebo dojde k neodstranitelné poruše DNA při její replikaci a v takovémto případě je v dělicí se buňce aktivován apoptotický program vedoucí k buněčné smrti. Regulace obou dějů se protíná v podobě tumor supresorového proteinu P53.

Tento jaderný fosfoprotein je primárně transkripční faktor aktivující genovou expresi negativních regulátorů buněčného cyklu a aktivátorů apoptózy. Přestože je znám již téměř 40 let, každým rokem jsou nacházeny nové funkce tohoto podivuhodného proteinu. Protein P53 (393 aminokyselin) má typické uspořádání společné všem transkripčním faktorům. N-koncová



Obr. 1.14 Regulace aktivity P53. Bazální koncentrace P53 je zajištěna pomocí jeho trvalé exprese a řízené degradace zprostředkované jeho ubiquitinligázou MDM2. Protože gen *MDM2* je transaktivován P53, snížení koncentrace P53 snižuje i expresi MDM2, a naopak. Tento fyziologický reostat může být přerušen za různých stresových stavů (např. onkogenní hyperstimulací či poškozením DNA, kdy dochází k modifikaci [např. fosforylaci] P53, který v hyperfosforylovaném stavu není degradován MDM2 a může transaktivovat geny negativně regulující buněčný cyklus či aktivující apoptózu). Aktivace onkogenní hyperstimulací (způsobenou hyperaktivitou onkogenu E1A, MYC, RAS) je zprostředkována proteinem P14^{ARF} (alternativní transkripční produkt genu P16^{INK4A}), který se váže na MDM2 a znemožňuje jeho interakci s P53. Při poškození DNA je aktivována kináza ATM (a CHK2), které fosforylují P53 a MDM2, znemožňují jejich vzájemnou interakci a stabilizují P53 pro transaktivaci jím řízených genů.

ATM – ataxia-telangiectasia mutated; CHK2 – checkpoint 2 protein; E2F1 – transcription factor E2F1; MDM2 – mouse double minute homologue 2 E3 ubiquitin ligase; NOXA – noxa protein; P14/ARF – protein P14 / alternate reading frame protein product of CDKN2A gene; PUMA – P53-upregulated modulator of apoptosis (nazývaný též BBC3); Ub – ubiquitin

transaktivační doména (TAD) slouží ke komunikaci s transkripčním aparátem, DNA-vázací doména (DBD) umožňuje jeho vazbu na specifické promotory obsahující P53 responzivní element* a C-terminální tetramerizační (TET) a regulační doména zprostředkovává vznik transkripčně aktivního homotetrameru.

Protein P53 je v buňce trvale exprimován. Jeho krátký biologický poločas a nízká intracelulární koncentrace jsou fyziologicky udržovány degradací P53 řízenou pomocí ubiquitinligázy MDM2. Expresi MDM2 proteinu je regulována transaktivací *MDM2* genu transkripčním faktorem P53, čímž je udržována stálá, ale nízká intracelulární koncentrace P53 (obr. 1.14). Protein P53 je inaktivován rovněž proteinem MDMX, který je příbuzný MDM2, ale postrádá ubiquitinligázovou aktivitu.

V důsledku řady stresových podnětů dochází ke stabilizaci proteinu P53 provázené rychlým zvýšením jeho intranukleární koncentrace. Ke stabilizaci proteinu P53 přispívá inhibice jeho degradace (inhibice MDM2), ale i jeho kovalentní modifikace (fosforylace). Základním stabilizačním signálem je fosforylace P53 zprostředkovaná několika kinázami v závislosti na různém charakteru stresoru (ATM, ATR, CHK2, DNA-PK, JNK, HYPK2, AMPK), ale i další kovalentní modifikace (acetylace, metylace, PARylace, monoubikvitinylace, SUMOylace, NEDDylace, glykosylace) katalyzované rozsáhlým seznamem různých enzymů, které se pravděpodobně významným způsobem podílejí na následných transkripčně aktivačních či transkripčně represorových funkcích P53.⁴³⁾

* Responzivní element je krátká oblast DNA v promotoru genů umožňujících sekvenčně specifickou vazbu konkrétního transkripčního faktoru regulujícího genovou expresi. Pro vazbu P53 jej tvoří nukleotidová sekvence DNA obsahující dvě invertované repetice 5-RRRC(A/T)|(A/T)GYYY-3', kde R značí libovolný purin (A nebo G) a Y libovolný pyrimidin (C nebo T).

Do současné doby bylo popsáno více než 100 genů, jejichž genová exprese je řízena nebo významně ovlivňována transkripčním faktorem P53. Mezi nejdůležitější geny transkripčně regulované P53 (kromě *MDM2*) patří geny kódující proteiny regulující:

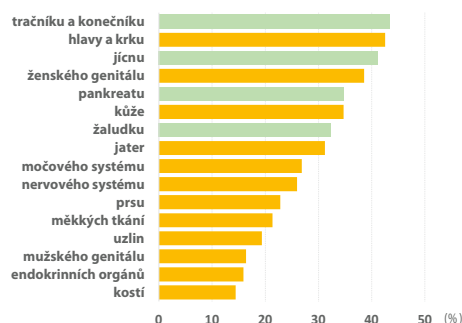
- **apoptózu** (viz kap. 1.3.2): BCL2-rodina (proapoptotický BAX), BH3-only proteiny (PUMA, NOXA),
- **buněčný cyklus** (viz kap. 1.3.1): CKI ($P21^{WAF1/CIP1}$), GADD45 (*growth arrest and DNA damage inducible gene*, inaktivuje PCNA), 14-3-3 σ (inaktivuje fosfatázu CDC25C nezbytnou pro aktivaci komplexu CDK1-cyklin B),
- **reparaci DNA** (viz kap. 1.2.2): NER dráha (XPE, XPC, XPG),
- **energetický metabolismus** (TIGAR – *TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*),
- **senescenci** ($P21^{WAF1/CIP1}$),
- **anti-angiogenezi** (TSP1 – trombospodin),
- **autofagii** (DRAM – *damage-regulated autophagy modulator*).

Z uvedeného, byť zjednodušeného výčtu vyplývá, že se P53 podílí na regulaci mnoha signálních drah v buňce a jeho inaktivace může mít dalekosáhlé funkč-

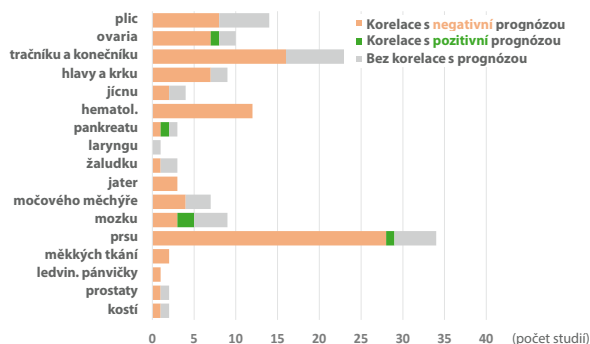
ní konsekvence s ohledem na nádorovou transformaci. Mutace v genu *P53* jsou jednou z nejčastějších poruch, která se vyskytuje přibližně u poloviny nádorových onemocnění (obr. 1.15). Na rozdíl od mnoha nádorových onemocnění jsou dominantními typy somatických patogenních mutací změny kódující sekvence vedoucí k záměně aminokyselin (*missense mutace*), které se preferenčně nacházejí v exonech kódujících DNA vazebnou doménu (DBD) a predilekčně postihují aminokyseliny mající zásadní význam pro interakci P53 proteinu s P53 responzivním elementem v promotoru (obr. 1.15D). Kromě ztráty fyziologických funkcí P53 mají některé mutace *P53* genu charakter *gain-of-function* alterací přispívajících ke zvýšení maligního potenciálu postižených buněk.⁴⁴⁾ S ohledem na četnost somatických mutací a obecně nepříznivou prognózu pacientů s mutacemi *P53* je regenerace funkce P53 mimořádně atraktivní. Zatím v pilotních podmínkách probíhá použití MDM2 inhibitorů (obr. 1.14) nebo reaktivátorů mutovaného P53 (eprenetapopt).⁴⁵⁾

Řada patogenních mutací v genu *P53* vykazuje dominantně negativní fenotyp, což znamená, že způsobují funkční poruchu P53 proteinu i v heterozygotní podobě a nevyžadují inaktivaci druhé alely. Tato odchylka od

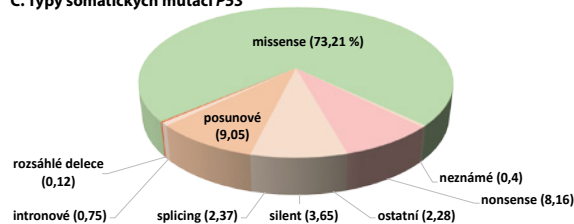
A. Četnost somatických mutací *P53* u nádorů



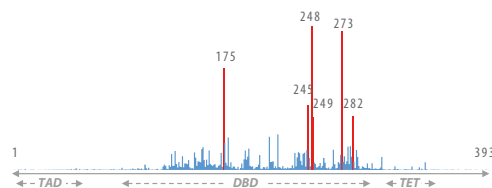
B. Prognostický význam somatických mutací *P53* u nádorů



C. Typy somatických mutací *P53*



D. Rozložení somatických mutací v proteinu *P53* (393 aminokyselin)



Obr. 1.15 Výskyt mutací v genu *P53* u různých nádorových onemocnění. Četnost dle lokalizace (A), prognostický význam mutací u nádorů v různé lokalizaci (B), typy somatických mutací identifikovaných ve vzorcích nádorů (C) a četnost somatických mutací postihujících jednotlivé aminokyseliny kódující sekvence (plná čára se šipkami, D).

(zpracováno podle dat IARC *P53* databáze k 1. 3. 2016 [<http://p53.iarc.fr/>])

Knudsonovy hypotézy (viz kap. 1.1 *Základní charakteristiky nádorových onemocnění*) je způsobena tím, že transkripčně aktivační funkce P53 závisí na jeho tetramerní podobě a při vzniku tetrameru složeného z wt a mut forem proteinu může nabývat celý komplex mutantní podobu.*

Kromě somatických mutací se u nádorových onemocnění setkáváme i s funkční inaktivací proteinu P53 virovými onkoproteiny (např. E6 proteinem HPV u karcinomu děložního hrdla; viz kap. 1.2.1, tab. 1.3). Virové onkoproteiny katalyzují eliminaci P53 proteinu zvýšením jeho ubikvitinylace a následnou degradaci v proteazomu.

Podobné zastoupení patogenních mutací s převahou missense variant mají i zárodečné mutace v genu *P53* způsobující **Liův–Fraumeniho syndrom**, který se vyznačuje extrémním rizikem (u žen dosahuje penetrance onemocnění 93 %, u mužů 68 %) vzniku řady nádorů. Nejčastějším nádorovým onemocněním je karcinom prsu u žen (naprostá většina vzniká u nosiček do 40 let věku), dále sarkomy, nádory CNS, akutní leukemie, adrenokortikální karcinom a další.

Přítomnost somatických mutací v genu *P53* je u většiny onemocnění spojena se zhoršenou prognózou. Význam *P53* a četnost výskytu jeho mutací vedla k logické snaze vyvinout lék cílící přímo na mutantní P53 proteiny, reindukující aktivitu wt formy P53.⁴⁵⁾ Přes významnou snahu řady vědeckých skupin i farmaceutických společností se masivní klinická implementace P53-cílené léčby mívá účinkem.

1.3.4 Poruchy mitogenní signalizace

Z předcházejícího textu shrnujícího význam poruch buněčného cyklu a apoptózy vyplývá, že signální dráhy modulující mitogenezi, diferenciaci a citlivost k apoptóze sehrávají významný vliv na proliferaci nádorových buněk. Tato signalizace zahrnuje desítky membránově vázaných receptorů pro hydrofilní signální molekuly (např. peptidové hormony, lokální mediátory, antigenní struktury extracelulární matrix), intracelulární receptory pro lipofilní látky (např. steroidní hormony) a stovky intracelulárních proteinů, které se podílejí na přenosu signálu, jeho směřování a ovlivnění jeho intenzity. Cílem promitogenní signalizace je buněčné jádro, kde ovlivnění genové exprese aktivuje syntézu regulátorů

buněčného cyklu. Celý systém zahrnuje několik logických a kompartmentových úrovní:

- **Signální ligandy** aktivují specifické membránové nebo intracelulární receptory:
 - **růstové faktory** (EGF, FGF, IGF, VEGF),
 - **cytokiny** (interleukiny, interferony, TNF),
 - **ligandy ostatních receptorů**,
 - **steroidní hormony a další lipofilní látky**.
- **Membránové receptory** přenášejí specifický signál hydrofilních molekul přes cytoplazmatickou membránu:
 - **receptory pro růstové faktory** (např. EGFR, ERBB2; receptorové tyrosinkinázy),
 - **receptory pro cytokiny** (např. TNFR1; IL6R),
 - **membránové receptory dalších signálních drah** – signalizace TGFβ (TGFBR), Sonic hedgehog (PTCH), WNT/β-katenin.
- **Adaptorové proteiny** umožňují směřování signálu v perimembránovém prostoru uvnitř buňky z cytoplazmatické části aktivovaných receptorových komplexů na signální proteiny šířící signál cytoplazmatickým kompartmentem (např. GRB2). Adaptorové proteiny postrádají enzymovou aktivitu, ale umožňují regulované směřování signálu.
- **Signální transducery** (přenašeče signálu, např. KRAS, HRAS, NRAS) zachycují signál z aktivovaných receptorových komplexů ukotvených v cytoplazmatické membráně s navázanými adaptory na volné signální molekuly cytoplazmy.
- **Cytoplazmatické kinázy** (např. RAF, MAPK, JAK, SRC) fosforylují různé proteiny v cytoplazmě. Zprostředkovávají distribuci signálu, jeho amplifikaci při průchodu cytoplazmou a směřování do buněčného jádra. Integrují mitogenní signály do dalších biochemických stavů v buňce.
- **Jaderné receptory** (např. estrogení receptor, androgení receptor, RXR receptor) a **transkripční faktory** (např. MYC, STAT, NF-κB) ovlivňují genovou expresi na základě distribuovaných signálů a v rámci regulace mitogeneze řídí aktivaci genů pro regulátory buněčného cyklu.

Poruchy působící stimulaci onkogeneze se vyskytují na všech úrovních signálně transdukčních drah. S ohledem na amplifikační charakter signální transdukce a větvení/propojení jednotlivých signálních systémů

* Výsledky řady studií ukazují, že dominantně negativní mutantní P53 proteiny mohou transaktivovat jinou sadu genů, než jsou geny regulované wtP53. Přitom exprese některých genů regulovaných mutP53 proteiny má pronádorové účinky.

mají obvykle poruchy proximální části signalizace (receptorová a blízká post-receptorová úroveň) zásadnější dopad (vyšší onkogenní potenciál) než části signálních cest stimulovaných při přenosu signálu cytoplazmou. Na druhou stranu, řízená inhibice hlubších signálních struktur může ovlivnit několik signálních drah, které počínají rozličnými spouštěči signálu. Pro onkogenezi jsou však rovněž zásadní poruchy specifických transkripčních faktorů, které pozitivním (jako onkogeny – estrogen receptor; NFκB) či negativním (např. P53) způsobem regulují mitogenezi.

Percepce, přenos a distribuce mitotických a antimitotických signálů využívá řadu strategií. V následujícím textu shrneme jejich základní mechanismy, poruchy vznikající v průběhu nádorové transformace a identifikujeme místa umožňující cílenou regulaci aberantní signalizace, která je základem cílené léčby onkologických onemocnění (tab. 1.8).

Signalizace receptorů pro růstové faktory (receptorové tyrosinkinázy)

Receptory pro růstové faktory jsou dominantními zastupci receptorových tyrosinkináz (tab. 1.9) s mitogenními účinky. Tvoří rozsáhlou skupinu signálních proteinů produkovaných lokálně buňkami řady tkání, na které zpětnovazebně působí. Jedná se (na rozdíl od hormonů) o signalizaci s krátkým dosahem účinku (autokrinní, parakrinní, juxtakrinní apod). Růstové faktory ovlivňují intracelulární signalizaci řadou způsobů. Kromě mitotické aktivace mohou v některých případech působit i antimitoticky a jejich účinkem dochází i ke změně v diferenciaci buněk. Růstové faktory působí jako monomerní (např. EGF) nebo dimerní (např. VEGF) molekuly.

Růstové faktory působí prostřednictvím svých specifických receptorů (**receptory pro růstové faktory**) ukotvených v cytoplazmatické membráně cílových buněk. Do

extracelulárního prostoru vyčnívá ligand vázající doména (ektodoména) receptoru interagující specificky s jedním nebo několika příbuznými růstovými faktory. Receptory pro růstové faktory se vyznačují přítomností **tyrosinkinázové domény**, která je integrální součástí polypeptidového řetězce receptoru zasahujícího do cytoplazmatického prostoru. Stimulace receptorů pro růstové faktory ligandem indukuje dimerizaci receptorových molekul a změnu jejich strukturního uspořádání (konformace), která se v cytoplazmatické části receptoru projeví aktivací jeho tyrosinkinázové domény.* Pomocí aktivovaných kinázových domén se receptorové dimery recipročně fosforylují (**transfosforylace**) na řadě tyrosinových zbytků. Fosforylace OH skupin tyrosinů obsažených v cytoplazmatické doméně způsobuje její významnější konformační změny rozpoznávané různými efektorovými proteiny, které se na aktivované receptory váží pomocí specifických vazebných domén (např. SH2, PTB) a v řadě případů spolu o vazbu soutěží. Efektorové proteiny aktivovaného receptorového komplexu mohou být molekuly různých typů s enzymovou aktivitou nebo bez ní:

- P85 podjednotka PI3K,
- PLCγ,
- SRC kináza,
- RASA1 (enzym aktivující GTPázovou aktivitu RAS),
- adaptorové proteiny RAS signalizace (GRB2, SHC) nebo IRS1,
- fosfatáza SHP2.

Tento (neúplný) výčet si klade za cíl ilustrovat, jak rozsáhlé signální možnosti skýtá již jen proximální část intracelulární kaskády receptorových tyrosinkináz. Pochopitelně, že aktivace konkrétních receptorů nezpůsobuje chaotické víření efektorových proteinů, ale umožňuje navázání v dané chvíli exprimovaných efektorových proteinů na aktivované receptorové molekuly.

* K aktivaci tyrosinkinázových receptorů může u nádorových buněk dojít i vlivem aberantní hyperexprese receptoru (při amplifikaci receptorového genu), kdy receptorové molekuly nabohacené v membráně kolidují, a tím aktivují své tyrosinkinázové domény (např. HER2). Častou poruchu reprezentují **fúze receptorových genů** s jinými proteiny (např. *BCR-ABL*, *ELK-RET*, *ETV6-NTRK3*, *EML4-ALK*). Aktivovaná tyrosinkinázová doména katalyzuje přenos fosfátu z ATP na OH skupinu tyrosinového zbytku polypeptidového řetězce v molekule receptoru nebo v proteinu nacházejícím se v bezprostředním okolí. Strukturní podobnost tyrosinkinázových domén v receptorech pro růstové faktory, ale i v dalších nereceptorových tyrosinkinázách, je důvodem obtížné přípravy vysoce specifických nízkomolekulárních inhibitorů, které se nejčastěji váží do katalytického centra tyrosinkinázy. Proto řada nízkomolekulárních inhibitorů inhibuje hned několik tyrosinkináz (např. imatinib – derivát 2-fenylaminopyrimidinu) – inhibuje fúzní protein *BCR-ABL* [kinázu vznikající v důsledku translokace t(9;22) – filadelfského chromozomu – u CML], *PDGFR* a *KIT* [receptorové tyrosinkinázy zvýšeně exprimované u GIST]. Mutace cílových tyrosinkináz v oblasti vazebného místa inhibitoru způsobují vznik rezistence (např. u pacientů s GIST mutace *PDGFRα* p.D842V postihující oblast vazebné domény pro ATP vede k rozvoji rezistence na imatinib, který se váže do tohoto místa; v homologní sekvenci receptoru *KIT* takto působí mutace p.D816V).

Tab. 1.8 Příklady nízkomolekulárních inhibitorů a protilátek cílených na inhibici signálních kináz. Receptorové tyrosinkinázy jsou označeny červeně, jejich ligandy zeleně, nerekceptorové kinázy modře.

	ALK	AXL	BCR-ABL	BTK	CDK4/CDK6	CSF1R	DDR1/2	EGFR (HER)	FGFR	FLT3 (CD135)	JAK	KIT	LCK	MEK	MER	MET	mTOR	PGDFR	PIK3CA	PKC	RAF (BRAF)	RET	ROS1	SRC	TIE2 (TEK)	TRK (NTRK)	TYK2	TYRO3	VEGFR	VEGF	
Nizkomolekulární inhibitor																															
abemaciclib					x																										
afatinib								x																							
akalabrutinib				x																											
alektinib	x																					x									
alpelisib																			x				x								
asciminib			x																												
avapritinib												x							x												
axitinib																														x	
binimetinib														x																	
bosutinib			x									x							x						x						
brigatinib	x							x																							
ceritinib	x																								x						
dabrafenib																						x									
dakomitinib								x																							
dasatinib			x									x							x							x					
deukravacitinib																															
duvelisib																				x								x			
enkorafenib																						x									
entrectinib	x																							x							
erlotinib								x																x			x				
everolimus									x									x													
gefitinib																															
gilteritinib										x																					
ibrutinib				x																											
idelalisib																				x											
imatinib			x			x	x					x							x												
kabozantinib		x								x		x				x							x	x		x	x		x	x	
kapmatinib																															
kobimetinib														x																	
krizotinib	x													x										x							
lapatinib								x																							
larotrectinib																															
lenvatinib									x			x							x				x							x	
lorlatinib	x																														
midostaurin																					x									x	
neratinib								x				x																			
nilotinib			x																												
nintedanib									x	x			x						x											x	
osimertinib								x																							
palbociclib					x																										
pazopanib													x						x											x	
pemigatinib									x																						
ponatinib			x						x	x			x						x					x						x	
pralsetinib																															
regorafenib							x												x				x	x			x			x	
ribociclib					x																		x	x			x				
ripretinib													x						x							x				x	
ruxolitinib												x														x				x	
selperkatinib																															
selumetinib																															
sorafenib										x				x					x											x	
sunitinib						x				x			x																	x	
temsirolimus																															
tepotinib																															
tivozanib																															
tivozanib																															
trametinib															x															x	
tukatinib								x																							
vandetanib									x																					x	
vemurafenib																															
Monoklonální protilátka																															
aflibercept																															
amivantamab								x									x														
bevacizumab																															
cetuximab								x																							
necitumumab								x																							
panitumumab								x																							
pertuzumab								x																							
ramucirumab																															
trastuzumab								x																							