

RACIONÁLNÍ INDIVIDUALIZACE PROTINÁDOROVÉ LÉČBY - MOLEKULÁRNÍ, BUNĚČNÉ A KLINICKÉ ASPEKTY.

¹Hajdúch M., ¹Trojanec R., ¹Nosková V., ¹Džubák P., ²Kolář Z., ¹Špačková K., ²Škarda J., ³Dušek L., ²Bouchal J., ¹Vydra D., ⁴Cwierka K., ⁵Žaloudík J., ¹Mihál V.

¹Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, ²Laboratoř molekulární patologie při Ústavu patologie LF UP a FN Olomouc, ³Centrum informatiky a analýz MU Brno, ⁴Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc, ⁵Masarykův onkologický ústav v Brně

I. Úvod

Podle oficiálních statistik Národního onkologického registru a Českého statistického úřadu je nádorové onemocnění příčinou úmrtí každého pátého občana v České republice a incidence tohoto onemocnění narůstá každoročně o 2-2.5%. Léčebné možnosti zůstávají zatím omezené, ale o určitém úspěchu svědčí minimální roční nárůst mortality (~ 0.9%).

I když se v současné době objevují nové léčebné strategie (například genová terapie), mezi nejdůležitější terapeutické postupy dosud patří protinádorová chemoterapie, která vedle chirurgie náleží k nejstarším způsobům léčby. Rozvoj současné chemoterapie je zaměřen nejen na vývoj nových typů cytostatik, ale rovněž na hledání dalších možností snížení toxicity terapie, omezení vzniku rezistence vůči terapii, účinnější profylaxe vzniku metastáz či na vytvoření cíleného léčebného režimu, individuálního pro každého pacienta. Současná klinická onkologie staví na výsledcích randomizovaných klinických studií a za léčebný standard je přijímán statisticky nejlepší léčebný postup. Přitom se nebere ohled na skutečnost, že i chemoterapie dosahující statisticky horšího výsledku může být individuálně účinnější. Důvodem je absence prediktivních testů v klinické onkologii a tudíž i minimální individualizace léčby, k níž se uchylujeme obvykle až po vyčerpání léčebných možností takzvané standardní, tedy paušalizované terapie. Perspektivním směrem v oblasti onkologické léčby je stanovení markerů, které specifikují způsob léčby a přispívají tak k individualizaci terapie. Touto problematikou se zabývá prediktivní onkologie, jejíž cílem je nalézt prognostické znaky, které budou spolehlivě předpovídat účinnost jednotlivých léčebných režimů a umožní vyloučení nevhodných či použití vhodných chemoterapeutik k léčbě. Mezi tyto prognostické znaky náleží i cytogenetické změny u nádorových buněk.

Cytogenetické metody jsou rychlé, relativně přesné a objektivně hodnotitelné, jejich nevýhodou jsou však vyšší náklady na provedení. Vhodným řešením je například metodika vyšetřování genu Her-2/neu (viz dále), kdy základní screening je proveden levnější imunohistochemickou metodou a teprve sporné případy jsou ověřovány cytogeneticky (metodou fluorescenční *in situ* hybridizace, FISH).

II. BUNĚČNÉ A GENETICKÉ MARKERY V KLINICKÉ PRAXI

1. Mnohočetná léková rezistence (MDR)

Velký význam v predikci odpovědi maligních buněk na léčbu má určení mnohočetné lékové rezistence (MDR: Multi Drug Resistance). MDR vysvětluje případy necitlivosti některých nádorů k alternativním léčebným režimům, obsahujícím takové druhy cytostatik, které nebyly použity v původní léčbě. V tomto případě nejde o sekundární (získanou v průběhu léčby), nýbrž o primární (přirozenou) rezistenci. MDR se rozdělila do 2 skupin:

1. Typická (klasická) MDR je zapříčiněna produktem MDR1 genu: membránovým P-glykoproteinem, což je ATP dependentní membránová pumpa, snižující intracelulární koncentraci léčiva. Z terapeutického hlediska je důležité, že vliv MDR lze obejít použitím chemosenzitorů v léčbě (například verapamil, cyklosporin A)
2. Atypická MDR: Všechny mechanismy mnohočetné lékové rezistence, kterých se neúčastní P-glykoprotein. Atypická MDR může být způsobena změnou subcelulární distribuce léčiva, poškozením cílové struktury léčiva, rozdílnou kapacitou DNA opravných procesů či změnami detoxifikačních drah. Na rozdíl od typické MDR nezahrnuje rezistenci na vinca alkaloidy. Atypická MDR bývá asociována zejména s těmito proteiny:
 - Multidrug Resistance-associated Protein (MRP): MRP je lokalizován na cytoplazmatické membráně a membránách endoplazmatického retikula a plní funkci jednosměrné ATP-dependentní membránové pumpy pro glutathion-S-konjugáty. Zvýšení exprese MRP je doprovázeno rostoucí chemorezistencí. **(Nosková et al., 2000a; Nosková et al., 2000b).**
 - Lung Resistance Related Protein (LRP): LRP protein je přirozeně exprimován v tkáních vystavených toxickým vlivům (trávicí trakt, keranocyty, bronchy). Vyšší exprese LRP je odrazem rezistence na široké spektrum protinádorových léčiv a není v lidských nádorech uniformní **(Nosková et al., 2000a; Nosková et al., 2000b).**
 - π -izoforma enzymu glutathion-S-transferázy (GST): účastní se detoxifikace buňky od volných radikálových forem, zejména kyslíkových radikálů, různých metabolických pochodů, včetně syntézy leukotrienů. Volné radikálové formy se tvoří i v průběhu chemoterapie alkylujícími látkami a bylo prokázáno, že tyto látky (cyklofosfamid, BCNU, thiotepa a další) jsou substrátem i pro GST **(Nosková et al., 2000a; Nosková et al., 2000b).**

Z klinického hlediska nebyly dosud nalezeny spolehlivé preparáty k inhibici atypické MDR (Nosková et al., 2000a; Nosková et al., 2000b). Nadějným preparátem se jeví snad pouze probenecis, který inhibuje MRP asociovanou MDR (Sirotnak et al., 2000).

2. Cytogenetické změny asociované s predikcí odpovědi nemocného na chemoterapii.

2.1. Hematologické malignity

Cytogenetické změny jsou popsány mnohem lépe u hematologických malignit než u solidních tumorů, avšak ani u hematologických malignit není u všech aberací zřejmé, zda a jaký prognostický význam mají pro cílenou terapii. Solidní tumory představují z cytogenetického hlediska velmi pestrou skupinu, přičemž u nich lze nalézt i některé alterace nacházené u hematologických malignit.

Jedním z prvních popsaných cytogenetických markerů je tzv. filadelfský chromozom (Ph-chromozom), objevený roku 1962 (Nowell, Hungerford). Jedná se o velmi stabilní znak, typický pro chronické myeloidní leukémie (CML), vyskytující se též v menší míře u pacientů s ALL (akutní lymfoblastická leukémie) a AML (akutní myeloidní leukémie), ale i u solidních tumorů. Při této translokaci dochází k vzniku hybridního BCR/ABL genu. Přítomnost či nepřítomnost této translokace a místo zlomu v BCR oblasti je důležitým prognostickým znakem při diagnostice typu onemocnění a hraje úlohu ve výběru léčby pacienta ať už klasickou vysoko dávkovanou chemoterapií nebo specifickým inhibitorem tyrozinkinázové aktivity BCR-ABL, preparátem STI-571 (Glivec) (Michalová, 1999).

Dalším ze zajímavých hemato-onkologických prediktivních faktorů je trizomie, či polyzomie chromozomu 21 u akutních lymfatických leukémií (ALL). V oblasti 21q22.2-3 se nachází RFC gen (Reduced Folate Carrier), jehož produkt se účastní transportu redukováných folátů v savčích buňkách. Mezi látky transportované produktem tohoto genu patří i metotrexát a proto jsou buňky s amplifikací RFC genu jsou na metotrexát citlivější, což určuje další postup v léčbě. Přítomnost tohoto genu také vysvětluje vysokou, často letální toxicitu metotrexátu pro pacienty s trizomií chromozomu 21 (Downův syndrom). (Kusumakury et al., 1997; Belkov et al., 1999)

Trizomie či polyzomie chromozomu 21 nebývá jedinou alterací v karyotypech u ALL. Karyotypy bývají naopak nezdědka komplexní a kromě polyzomie chromozomu 21 (až 35% případů), je často nalézána polyzomie chromozomů X (31%), 18 (27%), 10 (26%), 6 (25%), 17 (25%), 4 (23%) a 14 (22%) a delece chromatinu v oblastech 9p (18%), 12p (11%), 13q (9%), 6q (9%), 7p (8%) a X (6%) (Jarošová et al., 2000). Hyperdiploidie >50 je například u dětské ALL všeobecně považována za dobrý prognostický znak, i když asi 20% pacientů je postiženo relapsem. Faktory, které zodpovídají za nedobrou prognózu v této skupině jsou ztráta trizomie u chromozomů 4 a 10 a přítomnost i(17q) (Mihál et al., 2000). Za prognosticky nepříznivý znak u dětských ALL je považována i delece 9p22~pter. V této oblasti jsou lokalizovány 2 tumor supresorové geny p16 (CDKN2) a p15 (CDKN2B), účastníci se kontroly buněčného

cyklu. Také například delece 13q12~qter u dětských ALL předpovídá špatnou prognózu, neboť deletovaná část chromozomu nese tumor supresorový gen RB1 (**Jarošová et al., 2000**).

Za dobrý prediktivní faktor, a to senzitivity na léčbu L-asparaginázou, je na základě empirických údajů u dětských ALL pacientů považována translokace t(12;21)(p12;q22), zahrnující geny TEL-AML1. Pacienti s touto translokací jsou řazeni do skupiny s velmi dobrou prognózou a nízkým počtem recidiv (**Mihál et al., 2000; Mihál, 2000**).

Dalším významným prognostickým markerem je přítomnost translokací zahrnujících gen pro receptor kyseliny α -retinové (RARA). RARA je ligand-dependentní transkripční faktor, důležitý zvláště pro diferenciaci a maturaci hematopoetických buněk. RARA je receptorem pro ATRA (All-trans Retinoic Acid) a 9-cis retinovou kyselinu, což jsou deriváty metabolitů vitamínu A, aktivní v buněčné diferenciaci a morfogenezi. Nejčastější translokací jíž se RARA účastní je t(15;17)(q22;q11), charakteristická pro pacienty s akutní promyelocytární leukémií (APL, AML M3). V této translokaci je gen RARA přemístěn do blízkosti genu PML (Promyelocytic Leukemia Gene) na chromozomu 15. Produkt vzniklého fúzního genu je pak slabší transaktivátor než RARA, v komplexu s 9-cis retinovou kyselinou. Pacienti s touto aberací však zůstávají citliví na léčbu retinoidovými deriváty ATRA, což je řadí do skupiny s dobrou prognózou. Díky velmi nízké toxicitě této léčby se v současné době ověřuje možná účinnost ATRA terapie i u solidních tumorů s amplifikací RARA genu (**Ariga et al., 2000; Yang et al., 1999**).

Dalšími typickými alteracemi nacházenými u hematologickým malignit, a to především u B-buněčných typů či Burkittova lymfomu, jsou t(8;14), t(2;8) a t(8;22). Těmito prognosticky nepříznivými translokacemi je přemístěn gen C-MYC do blízkosti genu pro těžký [t(8;14)] či lehký [t(2;8) a t(8;22)] imunoglobulinový řetězec, dostává pod kontrolu jejich promotorů a je spolu s imunoglobuliny kontinuálně exprimován, čímž je podporována buněčná proliferace (**www.infobiogen.fr; Heim et al., 1995; Takashi et al., 2000**). Podobným způsobem může být aktivován například i další protoonkogen ovlivňující buněčnou proliferaci – Cyclin D1 [například t(11;14)] (**www.infobiogen.fr; Heim et al., 1995**)

2.2. Solidní nádory

Nemocní se solidními tumory tvoří z cytogenetického hlediska velmi různorodou skupinu. U těchto pacientů lze nalézt jak aberace typické pro danou diagnózu, tak i typy cytogenetických změn, vyskytující se nezávisle na diagnóze. V této kapitole jsou popsány zejména alterace jednotlivých protoonkogenů (dominantních onkogenů) a tumor supresorových genů (recesivních onkogenů), které mohou mít, či již prokazatelně mají svůj impakt pro prognózu pacienta, anebo pro zpřesňování cílené terapie.

2.2.1. Protoonkogeny Her-2/neu, TOP2A a RARA

Her-2/neu onkogen (Human Epidermal Growth Factor Receptor) byl identifikován v roce 1981 v linii krysího neuroblastomu a je identický s c-erbB-2 onkogenem. Kóduje 185 kDa transmembránový glykoprotein s tyrozin-kinázovou aktivitou, který je téměř shodný s 170kDa receptorem epidermálního růstového faktoru (EGFR). Vazbou ligandu EGF na extracelulární doménu dochází ke konformačním změnám, dimerizaci a polymeraci receptoru. Tato formace pravděpodobně reguluje jeho autofosforylaci a tyrozin-kinázovou aktivitu, čímž může být aktivováno buněčné dělení. Kromě EGF váže Her-2/neu také TGF α (transformující růstový faktor α). Jde o účinný onkogen, který způsobuje transformaci buněk dokonce i při neúčasti EGF. Zdá se, že erbB-2 může po navázání dosud neidentifikovaného ligandu heterodimerizovat i s ostatními členy erbB (Her) rodiny (tj. Her1, Her2, Her3 a Her4) a hraje hlavní roli v signální transdukcii všech členů této rodiny (**Jardines et al., 1993; Perez et al., 1999; Ross et al., 1998; Järvinen et al., 2000; Gianni et al., 1998; Gianni et al., 1999; Pegram et al., 1998; Baselga et al., 1998; Perry et al., 1999**)

Běžné lidské buňky exprimují malé množství Her2 proteinu na cytoplazmatické membráně. Amplifikace a nadprůměrná exprese Her-2/neu vede ke zvýšení hladiny mitogenního signálu a tím navozuje nadměrnou, na ligandu nezávislou proliferaci buněk. Nejčastěji se jedná o pacientky s karcinomem prsu, kde je Her-2/neu amplifikován až u 30% případů, dále o pacienty s nádorem plic, pankreatu, prostaty, ovarií či žaludku. Buňky se zvýšenou expresí Her-2/neu bývají obvykle málo diferencované, nemají přítomny hormonální receptory a onemocnění obvykle zasahuje též uzliny. Pacienti mívají obyčejně horší prognózu s ohledem na délku období bez nemoci i na celkovou dobu přežití. (**Perez et al., 1999; Ross et al., 1998; Järvinen et al., 2000; Gianni et al., 1998; Gianni et al., 1999 et al.; Pegram et al., 1998; Baselga et al., 1998; Perry et al., 1999**)

Ukazuje se, že buňky s amplifikací Her-2/neu onkogenu jsou všeobecně citlivější k antracyklinové léčbě, zatímco rezistence či citlivost k léčbě taxany zůstává předmětem diskuze. Buňky se zvýšenou expresí Her-2/neu jsou citlivé na léčbu doxorubicinem (**Gianni et al., 1998; Gianni et al., 1999**) i paclitaxelem (**Gianni et al., 1998; Gianni et al., 1999**) nejenom v podmínkách *in vitro*, ale také *in vivo*. Zvýšená exprese Her-2/neu u pacientů koreluje s dobrou odpovědí na léčbu paclitaxelem, i když nedochází k odstranění patologických změn v buňce (**Sparano et al., 1999**).

Mluvíme-li o citlivosti Her-2/neu amplifikovaných buněk na cytostatika, je třeba podotknout, že citlivost na inhibitory topoizomerázy II (jako je například doxorubicin) může být způsobena i současnou amplifikací TOP2A genu (**Smith et al., 1993; Keith et al., 1992**).

V současné době probíhá intenzivní výzkum možnosti léčby karcinomu prsu aplikací protilátek proteinu p185^{Her2}, popřípadě v kombinaci s cytostatiky. Tyto protilátky mohou inhibovat růst nádoru a transformovat buňky, které produkují vyšší hladinu proteinu p185^{Her2}. (**Pegram et al., 1998; Baselga et al., 1998; Perry et al., 1999**). Byla vytvořena protilátka trastuzumab (Herceptin, Genetech), orientovaná

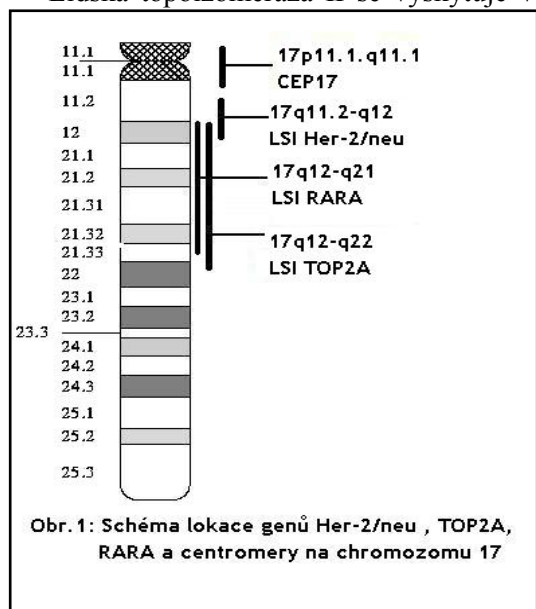
proti extracelulární doméně p185^{Her2}. Herceptin inhibuje růst buněk karcinomu prsu se zvýšenou expresí p185^{HER-2} receptoru jak v *in vitro* podmínkách, tak u nádorových xenotransplantátů (**Baselga et al., 1998; Perry et al., 1999**).

Ve studiích fáze III byla potvrzena účinnost u refrakterního karcinomu prsu. Bylo prokázáno, že trastuzumab zvyšuje klinický benefit chemoterapie první linie u nemocných s metastatickým karcinomem prsu a zvýšenou expresí Her-2/neu. Jsou připravovány nové studie včetně genové terapie a vakcinace. Byly připraveny Her-2/neu monoklonální protilátky pro radionuklidové zobrazovací metody, zvláště pro detekci mikrometastáz a pro chemoradioterapii. Trastuzumab byl schválen v řadě zemí pro léčbu první linie u primárně metastatického karcinomu prsu (v České republice od 1.července 2001) a tím se vyšetřování HER-2/neu jeví jako velmi důležité pro určení prognózy a predikce léčebné odpovědi. Použití Herceptinu v klinické praxi významně přispívá k zvýšení účinnosti terapie a prodloužení života u pacientů s amplifikací Her-2/neu (**Perez et al., 1999; Ross et al., 1998; Järvinen et al., 2000**).

Početní změny genu Her-2/neu bývají často spojeny i se změnami v počtu genů kódujících topoizomerázu II α , neboť tento gen (TOP2A) je lokalizován na chromozomovém pruhu 17q12-q21, v těsném sousedství genu Her-2/neu (17q11.2-q12), viz obr.1. (**Murphy et al., 1995; Keith et al., 1993; Lichy et al., 2000**).

Enzymová aktivita topoizomeráz se uplatňuje zejména při organizaci terciální struktury DNA. DNA topoizomerázy II jsou v buňce nutné k zajištění replikace, transkripce, ale i segregace či kondenzace chromozomů a proto je zvýšená exprese TOP2A (TopoII α) zaznamenávána v S, G₂ a M fázích buněčného cyklu (**Sparano et al., 1999**).

Lidská topoizomeráza II se vyskytuje ve dvou vysoce homologních izoformách – izoformě α (170



kDa) a izoformě β (180kDa). Topoizomeráza II je cílovou molekulou pro řadu cytostatik, tzv. topoII inhibitorů. Zvýšené množství topoizomerázy dané amplifikací TOP2A genu disponuje nádorové buňky k vyšší citlivosti na topoII inhibitory (například antracykliny) a toto vyšetření tak může ovlivnit výběr protinádorových léčiv u karcinomu prsu. Většina inhibitorů DNA topoizomeráz se současně váže na DNA řetězce a molekulu DNA topoizomerázy za vzniku stabilního komplexu, čímž jsou stabilizovány zlomy v DNA řetězcích, je zabráněno opětovné ligaci rozštěpených DNA vláken a indukují se DNA reparační mechanismy nebo apoptóza. (**Shimizu et al., 1996**). Mezi

topoII inhibitory patří například epipodofylotoxiny (vepesid a tenipozid), antracykliny (daunorubicin, doxorubicin, idarubicin) dále mitoxantron a amsakrin aj. (Vorlíček et al., 2000).

In vivo byla u 50% nádorů prsu s amplifikací Her-2/neu genu nalezena taktéž amplifikace TOP2A (Järvinen et al., 2000). Udávané procento výskytu koamplifikovaných případů se však v různých studiích liší (Murphy et al., 1995; Smith et al., 1993; Charron et al., 1990; Gotlieb et al., 2001).

Receptor kyseliny α retinové (RARA: Retinoic Acid Receptor Alpha) je hormonálně závislý transkripční transaktivátor, zahrnutý v regulaci buněčné diferenciace a proliferace. Podobně jako gen pro Her-2/neu a TOP2A je RARA lokalizován v oblasti 17q12-q21 a bývá spolu s oběma geny často koamplifikován (viz obr.1). Bylo již prokázáno, že případy nemocných s ductálním karcinomem prsu (DISC), pozitivními estrogenovými receptory a vysokou proliferační aktivitou jsou asociovány se změnami v RARA. Jelikož je léčba retinoidy poměrně málo toxická, je důležité ověřit, zda existují prediktivní znaky umožňující identifikovat nemocné se solidními nádory a dobrou odpovědí na terapii retinoidy. Lze se oprávněně domnívat, že právě pacientky s amplifikací Her-2/neu a koamplifikací RARA budou citlivější k retinoidům, které by se tak mohly vedle antracyklinů a Herceptinu stát další terapeutickou alternativou u této prognosticky nepříznivé skupiny nemocných (Murphy et al., 1995; Keith et al., 1993; www.infobiogen.fr).

2.2.2. Protoonkogeny náležící do MYC rodiny

Do této rodiny jaderných transkripčních faktorů náleží několik genů (C-MYC, N-MYC, L-MYC a S-MYC), z nichž nejnámější jsou C-MYC a N-MYC. N-MYC (2p24.1) amplifikaci nacházíme nejčastěji u neuroblastomů (15% případů), kde má diagnostický význam, amplifikace genu C-MYC bývá nalézána u různých typů maligních onemocnění (například ovariální karcinom, hormonálně independentní karcinom prostaty a prsu, nádory měkkých tkání, či méně častěji u karcinomu tlustého střeva). (www.infobiogen.fr; Schmidt et al., 1999; Lee et al., 1999; Dang et al., 1999)

C-MYC gen je lokalizován v oblasti 8q24. Kóduje jaderné DNA vazebné proteiny, ovlivňující v buňce proliferaci i apoptózu. MYC protein dimerizuje s proteinem MAX. MYC-MAX dimerizace probíhá na specifické DNA sekvenci (CACGTG), která byla nalezena v promotorových sekvencích některých genů. Zvýšená exprese genu pro MAX protein vede ke vzniku homodimeru MAX-MAX, čímž je regulována aktivita MYC genu. S proteinem MAX však mohou dimerovat i proteiny MAD a MXI-I a „soutěžit“ s dimerem MYC-MAX o CACGTG vazebné místo. Na základě přítomnosti či absence růstových faktorů dochází k alteracím v expresi genů kódujících tyto proteiny a tím i v následném poměru jednotlivých heterodimerů v buňce. Zatímco MAX protein je poměrně stabilní a je exprimován konstitutivně, ostatní proteiny jsou v buňce rychle degradovány. Stimulace buněk vede ke zvýšení exprese MYC genu a tím vzniku MYC-MAX dimeru a aktivování dráhy vedoucí k mitóze či apoptóze. Zeslabení či odstranění

mitogenního stimulu vede ke snížení exprese MYC genu a ke zvýšení hladiny MAX-MAX, MAX-MAD a MAX-MXI-I dimerů. Koncentrace MYC-MAX dimeru je po zeslabení či odstranění mitogenního signálu snižována a tím dochází k omezení proliferační aktivity. Je-li však v takovýchto buňkách C-MYC nadále exprimován, podléhají buňky apoptóze (**Ford et al., 1997; Schmidt et al., 1999; Lee et al., 1999; Dang et al., 1999**).

C-MYC nemusí být v buňce patologicky aktivován pouze amplifikací. Tento gen se často účastní translokací, při kterých je přemístěn do blízkosti jednoho ze tří genů pro imunoglobuliny a to t(8;14), t(2;8) a t(8;22), dostává se pod kontrolu imunoglobulinových promotorů a je exprimován kontinuálně (**Dang et al., 1999**). Dalším možným způsobem onkogenní aktivace C-MYC je bodová mutace. Výsledkem těchto mutací bývá prodloužení poločasu života mutovaného proteinu (**Dang et al., 1999**).

Několik studií se zabývalo genem C-MYC jako potenciálním prognostickým faktorem pro určení senzitivity či rezistence k jednotlivým typům cytostatik, avšak tyto studie byly limitovány především úzkým výběrem biologického materiálu a úzkou škálou testovaných látek. Prognostická signifikance C-MYC genu byla ověřována i u karcinomu prsu, kde bývá nalezena amplifikace C-MYC genu asi u 20% případů (**Klijn et al., 1993; Berns et al., 1992**), nebyla ale prokázána korelace mezi amplifikací genu Her-2/neu a genu C-MYC (**Berns et al., 1992**). Navíc, prognostická hodnota Her-2/neu amplifikace je omezena na případy s negativními steroidními receptory, zatímco C-MYC amplifikace je silným prognostickým faktorem zvláště u uzlinově negativních karcinomů prsu s pozitivními steroidními receptory (**Berns et al., 1992**). Amplifikace genu C-MYC je u karcinomu prsu považována za negativní prognostický faktor, predikující časný relaps a celkově zkrácenou dobu přežití pacienta (**Klijn et al., 1993; Berns et al., 1992**); I když některé starší studie (**Varley et al., 1987; Bonilla et al., 1988; Cline et al., 1987**) popírají vztah mezi C-MYC amplifikací a velikostí tumoru, Berns et al. (1992) prokázal na souboru 282 pacientek signifikantní korelaci mezi amplifikací tohoto genu a mezi velikostí tumoru i počtem pozitivních lymfatických uzlin. Dále se ukazuje, že hladina C-MYC proteinu může ovlivňovat účinnost chemoterapie a to pravděpodobně tak, že C-MYC reguluje specifické procesy, jimiž se buňka vyrovnává s poškozením DNA cytostatiky, jako je například cis-platina (**Klijn et al., 1993; Biroccio et al., 2001**). Poškození DNA způsobují například i antracyklinová antibiotika (doxorubicin, daunorubicin). Tyto látky inhibují aktivitu enzymu topoizomerázy II, což vede k indukci zlomů v DNA. Na MCF-7 buněčné linii karcinomu prsu bylo prokázáno, že inhibitory topoizomerázy II, či ionizující záření, jsou schopny suprimovat expresi C-MYC, přičemž snížení hladiny C-MYC je považováno za nezbytný předpoklad k zastavení buněčného cyklu (**Gewirtz et al., 1998**).

Pacienti s amplifikací C-MYC také lépe odpovídají na léčbu 5-fluorouracilem a délka přežití takto léčených pacientů se zvyšuje při amplifikaci C-MYC genu až o 30% (**Arango et al., 2001**).

2.2.3. Geny účastnící se regulace buněčného cyklu anebo apoptózy

Nádorové buňky mají schopnost procházet buněčným dělením i s poškozením, které by u zdravé buňky vyvolalo programovou buněčnou smrt, apoptózu. Poškození či nesprávná funkce jednotlivých genů regulujících buněčný cyklus a apoptózu vede k maligní transformaci buňky. Cykliny a cyklin-dependentní kinázy (CDK) tvoří hlavní regulační systémy buněčného cyklu. Buněčným cyklem se souhrnně nazývají na sebe navazující děje, jimiž se mateřská buňka rozdělí ve dvě buňky dceřinné. V tomto cyklu musí dojít k replikaci genetického materiálu a jeho přesnému rozdělení mezi dvě dceřinné buňky. Buněčný cyklus je tvořen čtyřmi na sebe vzájemně navazujícími fázemi: G1, S (DNA syntéza), G2 a M (buněčné dělení-mitóza). Fáze G1 a G2 jsou mezifázemi, v nichž probíhá v buňce intenzivní metabolismus, zajišťující správné rozdělení buňky. K buněčnému cyklu bývá někdy přiřazována i fáze G0, což je období kdy se buňka nachází v klidovém stádiu, tj. není a ani nevstupuje do buněčného cyklu (**Ford et al., 1997; Klener et al., 2002**).

Za fyziologických podmínek je u mnohobuněčných organismů vstup do buněčného cyklu řízen soustavou extracelulárních růstových a mitogenních faktorů, vážících se na povrchové receptory buňky. Podnět je přenášen soustavou signálních drah směrem k jádru. Tyto signály mohou aktivovat buněčný cyklus a „provést“ buňku takzvaným restričním bodem (R-bod), který je lokalizován v pozdní G1 fázi. Jestliže buňka „projde“ tímto bodem, stává se nezávislá na růstových faktorech a pokračuje v dalších fázích buněčného cyklu. V průběhu buněčného cyklu je kontrolován jeho správný průběh, integrita DNA a její standardní rozdělení. Pakliže je v kterémkoliv kontrolním bodě detekován nevhodný průběh cyklu, může buňka indukovat programovou buněčnou smrt, apoptózu. Nesprávná funkce či vyřazení kontrolních bodů může vést k nekontrolovanému dělení poškozených buněk. Průběh jednotlivých fází a mezifázový přechod je regulován proteinovými komplexy cyklin-cyklin dependentní kináza. Jak cykliny tak i cyklin-dependentní kinázy jsou fázově specifické a jejich činnost je kontrolována vždy nejbližším následujícím kontrolním bodem (**Shapiro et al., 1999; Klener et al., 2002**).

Cykliny získaly své označení ze skutečnosti, že jsou v buňce přítomny pouze v určité části cyklu. Obsahují homologické oblasti o velikosti zhruba 100 aminokyselin, kterými se vážou na své partnery: cyklin-dependentní kinázy (CDK). Cykliny lze rozdělit do dvou skupin: G1 cykliny a mitotické cykliny. G1 cykliny jsou proteiny s relativně krátkou životností, zatímco mitotické cykliny mají životnost delší a zpravidla jsou odbourávány před vstupem buňky do mitózy (**Ford et al., 1997**).

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou Ser/Thr ATP-dependentní kinázy, zprostředkovávající přenos fosfátu na cílové substráty. CDK se aktivují vazbou na příslušný cyklin a dále fosforylací či defosforylací specifických. (**Ford et al., 1997**).

CDK mohou být inhibovány přirozenými polypeptidovými inhibitory, CDKI (inhibitory cyklin-dependentních kináz). Tyto inhibitory se rozdělují do 2 tříd:

1. Inhibitory INK4 třídy (například p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} či p19^{INK4d}) jsou přísně specifické pro cyklin D-dependentní kinázy CDK 4,6 a jsou proto spojovány s regulací G1 fáze. Principem inhibice je zabránění vazby cyklinu D na CDK, mohou však inhibovat i hotové komplexy cyklin D/CDK4,6 (**Veselý et al., 1998**).
2. G1/S CDKI = KIP/CIP CDKI (například p21^{WAF1,CIP1}, p27^{KIP1} či p57^{KIP2}) přednostně inhibují G1 a S-fázové CDK, ale na rozdíl od INK4 CDKI inhibují i všechny ostatní CDK. (**Ford et al., 1997; Veselý et al., 1998**).

Geny kódující CDKI mohou být mutované či deletované, například u hematologických malignit bývá nalézána delece 9p22~pter. V této oblasti jsou lokalizovány geny pro CDKI p16 (CDKN2) a p15 (CDKN2B) (**Jarošová et al., 2000**). Také například u osteosarkomu byly nalezeny alterace CDKI, a to u p19 (p19^{INK4D}), postihující asi 7% případů (**Miller et al., 1997**), či delece genu pro p18 [del(1p35-p31)] u adenomu přištitných tělísek (**Tahara et al., 1997**). Je nutné si uvědomit, že inhibitory CDK regulují přímo buněčný cyklus a jejich delecí či inaktivací dochází k alteracím v buněčném cyklu, vedoucím k nadstandardní proliferaci, popř. až k maligní transformaci (**Ford et al., 1997; Veselý et al., 1998**).

CYKLIN D1 (CCND1)

Jedním z klinicky nejdůležitějších cyklinů je cyklin D1, jehož gen je lokalizován na chromozomu 11 v oblasti q13 (CCND1 = PRAD1 [Parathyroid Adenomatosis 1] = BCL1 [B-cell Leukemia/Lymphoma]).(**www.infobiogen.fr**) Cyklin D1 je exprimován především G1 fázi buněčného cyklu, kde se účastní progresu G1 a přechodu G1 fáze do S-fáze. Expresse tohoto genu neprobíhá u klidových buněk, například lymfocytů. Účastní se několika translokací, z nichž nejběžnější je t(11;14)(q13;q32) u B-buněčných malignit a zvláště u lymfomů z pláštěvých buněk (Mantle Cell Lymphoma). Touto translokací se gen CCND1 dostává pod kontrolu promotoru genu pro imunoglobulinový řetězec (IgH) a dochází tak k jeho stabilní overexpresi (**www.infobiogen.fr**).

Gen CCND1 nemusí být kontinuálně exprimován jen díky aktivačním translokacím typu t(11;14)(q13;q32), ale byla prokázána jeho aktivace i retrovirovou inzercí. V takovýchto případech se gen pro cyklin dostává pod kontrolu virových promotorů, jimiž je iniciována kontinuální exprese (**Bates et al., 1995**).

Amplifikace či zvýšená exprese cyklinu D1 bývá nalézána u různých typů maligních onemocnění, například u primárního karcinomu prsu, ovariálních karcinomů, u hepatocelulárních karcinomů, malobuněčného karcinomu plic, hematologických malignit, u karcinomů dlaždicovitého epitelu hlavy a krku či jícnu (**Sherr et al., 1996; Bates et al., 1995; Courjal et al., 1996**). Amplifikací či nadměrnou expresí genu pro cyklin D1 dochází k alteracím v buněčném cyklu, často následovanými dalšími změnami

v jeho regulačních mechanismech a tyto změny mohou být součástí kancerogeneze buňky (**Courjal et al., 1996; Terada et al., 1999; Simpson et al., 1997**).

Z klinického hlediska je významné působení glukokortikoidů jako inhibitorů buněčné proliferace právě u případů s amplifikací či vysokou expresí cyklinu D1. Všeobecně platí, že nízká koncentrace glukokortikoidů v přítomnosti vhodného růstového faktoru vyvolává proliferaci, zatímco vysoká hladina glukokortikoidů proliferaci brzdí. Hlavním účinkem glukokortikoidů na buněčný cyklus je inhibice pRB fosforylace snížením aktivity cyklin D/CDK4 kinázy. Aktivita tohoto komplexu je zřejmě snižována vyšší expresí CDK inhibitoru p21^{Cip1}, která se například po léčbě dexametazonem může zvýšit 5-10x. Nedostatečná fosforylace pRB pak neumožní buňce vstoupit do S-fáze buněčného cyklu (**Fernandes et al., 1999; Terada et al., 2001**).

2.2.2.4. Tumor-supresorový gen RB1

Onkogeny (dominantní onkogeny) se liší od tumor supresorových genů (recesivních onkogenů) především tím, že vznikají jako mutantní formy v somatických buňkách, nikoliv v zárodečných. Mutantní nádorové supresorové geny se mohou vyskytnout i jako zárodečné mutace ve vajíčku či spermii a dědí se v potomstvu. Například dítě, které získalo mutantní formu tumor-supresorového genu RB1 je celý život ohroženo retinoblastomem i dalšími malignitami. Retinoblastom je choroba dětského věku, projevující se jako nádor na sítnici. Vyskytuje se jednak jako dědičná forma a jednak jako somatická mutace spojená s delecí pruhu q14 chromozomu 13. Do této oblasti byl lokalizován tumor-supresorový gen RB1. Při dědičné formě nese jeden chromozom mutaci tohoto genu a teprve po somatické mutaci v buňkách sítnice, kdy dochází k inaktivaci či delecii druhé kopie RB1 genu, se vyvíjí retinoblastom (**Shapiro et al., 1999; Rosypal, 1997**).

Gen RB1 kóduje RB-protein, který se v jádře vyskytuje v silně či slabě fosforylované formě a je kontrolním mechanismem buňky v takzvaném G1 restričním (R) bodě, (ne)dovolujícím buňce vstoupit do S-fáze buněčného cyklu. Hypofosforylovaná forma RB proteinu váže transkripční faktor E2F. Teprve po fosforylaci RB proteinu komplexem cyklin D/CDK 4/6 (2,5,6) dochází k uvolnění E2F faktoru. E2F se může vázat na promotorové elementy genů jako je například dihydrofolátreduktáza, tymidinkináza či DNA-polymeráza α , a tím je umožněn vstup buňky do S-fáze buněčného cyklu (**Shapiro et al., 1999; Courjal et al., 1996; Terada et al., 1999; Simpson et al., 1997; Rosypal, 1997**).

Některé viry syntetizují proteiny (E1A: protein adenovirů, E7: protein lidských papilomavirů, T-antigen viru SV40), které se v infikovaných buňkách vážou přednostně k RB proteinu a vytěsňují jej z komplexu s E2F. Volný E2F může otevírat permanentní vstup buňky do S-fáze, což vede k neregulované replikaci DNA a dělení buňky. Podobným mechanismem mohou fungovat i mutace RB1 genu, které způsobují neschopnost RB proteinu vázat se k E2F faktoru (**Rosypal, 1997**).

RB1 gen nacházíme mutovaný/deletovaný u různých typů malignit, jako například u karcinomu prsu či nádoru plic, přičemž inaktivní forma RB1 je asociována se zvýšenou proliferací buněk (**Ford et al., 1997; Gupta et al., 2001**). Z terapeutického hlediska je důležité si uvědomit, že RB protein je fosforylován komplexem cyklin D/CDK 4/6 (2,5,6), jehož aktivita může být snížena pomocí glukokortikoidů (**Fernandes et al., 1999**).

Samotná chemoterapie retinoblastomu bývá neúspěšná a současné klinické studie kombinují chemoterapii s lokální léčbou používající radioterapii, laserovou či kryogenní destrukci nádoru (**Conway et al., 1998**).

2.2.2.5. Tumor-supresorový gen TP53

Gen TP53 (17p13.1) kóduje protein p53, který může blokovat buňky v G1-fázi buněčného dělení. Inaktivace genu TP53 delecí či bodovou mutací vede k neoplastické transformaci a vzniku nádorů různých typů. Bylo popsáno asi 50 typů nádorů s mutací TP53 genu, z nichž největší část tvoří nádory kolorekta, plic a prsu. Široké spektrum nádorů s mutací či delecí TP53 indikuje, že p53 neurčuje jen tkáňově specifický děj, ale má obecný dosah týkající se regulace buněčného dělení. Alela inaktivovaná bodovou mutací může být i dědičná (Li-Fraumeni syndrom), ačkoliv počet rodin na světě trpících tímto syndromem je počítán pouze na desítky. Jedinci postižení touto chorobou mívají různé typy malignit. Umírají velmi brzo na onkologická onemocnění, která vypuknou po ztrátě heterozygoty, tj. po delecí či inaktivaci druhé alely (**Ford et al., 1997; Klener, 2002; Rosypal, 1997; Reisman et al., 1998; Varley et al., 2001**).

Protein p53 bývá často nazýván „strážcem genomu“. Normální buňky produkují pouze malé množství p53, které stačí k udržení regulace buněčného cyklu. Poškození DNA rentgenovým či UV-zářením anebo chemickými látkami vede k vyšší expresi p53 a zároveň se prodlužuje jeho poločas rozpadu. Zajímavé je i to, že zvýšenou expresi p53 může vyvolat i teplotní šok a to i když nedochází k poškození DNA. Zvýšením hladiny p53 se iniciuje exprese genu GADD45, kódující protein, který vazbou na PCNA inhibuje replikaci DNA a iniciuje expresi genu WAF/CIP1, kódující protein p21. Protein p21 inhibuje CDK a zastaví buněčný cyklus v G1-fázi. Buněčný cyklus je v případě správné funkce p53 obnoven až po odstranění chyb v DNA. Nejsou-li tyto chyby v DNA odstraněny, spouští p53 v buňce pochody vedoucí k apoptóze. (**Ford et al., 1997; Rosypal, 1997; Bennett et al., 1999**).

Až 90% mutací p53 je lokalizováno do DNA vazebné domény, regulující celkovou schopnost p53 vázat se na DNA. Protein p53 je funkční ve formě tetrameru, přičemž je-li jedna či více z těchto podjednotek mutovaných, celý tetramer je nefunkční. K inaktivaci p53 může dojít v zásadě čtyřmi způsoby:

1. Ztrátou heterozygotnosti a to tak, že v jedné alele se objeví bodová mutace a dojde k delecí druhé alely.

2. Negativně dominantní mutací: p53 mutantní alely genu TP53 mohou vytvořit s produktem standardní (wild-type) alely inaktivní komplex a to i bez ztráty heterozygotnosti.
3. Tvorbou komplexů s virovými proteiny (T-antigen viru SV40, E1B protein adenovirů či E6 protein papilomavirů) (**Ford et al., 1997; Reisman et al., 1998; Ahrendt et al., 1999**).
4. Zvýšeným odbouráváním p53 proteinu, například amplifikací genu MDM2 (**Nasir et al., 2001; Higashiyama et al., 1997**).

Buňka kontroluje hladinu, funkci a stabilitu p53 mnoha mechanismy, z nichž nejznámějším regulátorem je MDM2 (Murine Double Minute 2 = Mouse Double Minute 2) lokalizovaný v oblasti q13-14 chromozomu 12. Úlohou MDM2 je udržovat hladinu p53 na nízké úrovni a inhibovat jeho transkripční aktivitu. Po navázání MDM2 na N-terminální konec p53 dochází k rychlé degradaci p53 ubiquitinovou proteolýzou. Jedná se o regulaci na principu zpětné vazby, neboť gen pro MDM2 je transaktivován samotným p53 proteinem. Stresový signál (poškození DNA, teplotní šok atd.) může způsobit alterace ve vazbě MDM2 na p53. N-konec p53 může být například fosforylován na serinu 15 a takto upravený protein váže hůře MDM2 a proto je snížena rychlost jeho odbourávání. Fosforylace p53 je zajišťována pravděpodobně ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) kinázou a DNA-dependentní protein kinázou (DNA-PK). (**Reisman et al., 1998; Bennett et al., 1999; Cinelli et al., 1998; Bullock et al., 2001**).

Další studie prokázaly, že působením estradiolu se zvyšuje exprese genu C-MYC, což následně vyvolává vyšší expresi genu TP53, zatímco působením progesteronu se naopak hladina p53 snižuje (**Moudgil et al., 2001**). Bylo také popsáno, že p53 může indukovat HSP27 (Heat Shock Protein 27). HSP27 chrání buňku před apoptózou zvýšením intracelulární hladiny glutathionu, jenž je důležitý pro protekci buněk před apoptózou indukovanou oxidativním stresem, či jiným mechanismem zahrnujícím modulaci stability mikrofilamentů. Je však známo, že HSP27 exprese může být indukována i androgenní ablací (**Gao et al., 2000**). Byl studován rovněž vztah mezi p53 a dalšími onkogeny, s ohledem na jejich prognostický význam. Již roku 1997 Alexiev et al. porovnal své zkušenosti se zkušenostmi jiných autorů v léčbě benigních a maligních onemocnění prsu s ohledem na expresi genů Her-2/neu a TP53. Výsledky jsou poněkud kontroverzní, i když řada autorů přisuzuje genu TP53 velký význam v predikci chování nádoru. Na modelu karcinomu prsu bylo též prokázáno, že nadměrná exprese p53 je často doprovázena vyšší expresí Her-2/neu a RAS genu. Ačkoliv buňky mohou nadměrně exprimovat současně Her-2/neu i p53 bez zvýšené tvorby RAS proteinu, nadměrná exprese RAS genu je velmi vzácná u buněk které neobsahují abnormality p53 a/nebo Her-2/neu (**Smith et al., 2000**). Bylo publikováno, že p53 se přímo účastní kontroly Her-2/neu signální cesty a významně ovlivňuje efekt amplifikace Her-2/neu v nádorových buňkách. Her-2/neu transfekce je asociována s proliferační aktivitou pouze u buněk s mutovaným p53. Naopak u linií s *wild-type* formou p53 vedla nadměrná exprese Her-2/neu k apoptóze. Buňky které apoptóze nepodlehly vykazovaly nízkou proliferační aktivitu. Tento poznatek by mohl v

budoucnu ovlivnit Herceptinové léčebné režimy, protože pokud by tyto údaje byly potvrzeny *in vivo*, existuje možnost, že léčba Herceptinem bude efektivnější u nádorů se současnou amplifikací Her-2/neu a mutací TP53 genu (**Casalini et al., 2001**).

Aktivita *wild type* p53 je v buňce aktivována chemoterapeutiky jako je adriamycin, etopozid, doxorubicin, cis-platina aj., či například ionizujícím zářením. Odpovědí buňky na poškození DNA je indukce p53-dependentní apoptózy (**Mottollese et al., 2000**). Tato aktivace je možná i u některých mutantů p53 a navíc existují teplotně senzitivní mutace p53, které se při změně teploty mohou reaktivovat (**Pavlová et al., 2002**). Ačkoliv lze funkci některých p53 mutantů reaktivovat, u valné většiny pacientů jsou nalézány nefunkční mutanty či delece TP53. Nadějí pro tyto pacienty může být genová terapie (**Ford et al., 1997; Lax et al., 2001**).

2.2.6. Protoonkogeny rodiny RAS

Většina eukaryot obsahuje více než jeden protoonkogen C-RAS. Savci mají 3 velmi dobře definované protoonkogeny C-RAS (Rat Sarcoma Virus) a to H-RAS (Ha-RAS), K-RAS (Ki-RAS) a N-RAS. Proteiny kódované těmito protoonkogeny se označují jako p21^{RAS}. Tyto proteiny mohou vázat GTP a vykazují GTPázovou aktivitu. RAS p21 proteiny aktivují MAP (Mitogen Activated Protein Kinase) signální dráhu, čímž spouští syntézu DNA. Aktivní forma p21^{RAS} je za fyziologických podmínek regulována GTPázovými aktivačními proteiny (GAP). GAP proteiny konvertují aktivní p21^{RAS} na neaktivní, GDP vázající protein. Mezi GAP patří například 120 kDa protein p120-GAP, či neurofibromin, produkt NF1 genu (neurofibromatóza typu I). Mutanty obsahující onkogen RAS nehydrolyzují GTP a proto jsou trvale aktivní. Neustálé působení na cílový protein tak navozuje onkogenní proces. RAS protoonkogen je nejlépe prostudován u kolorektálního karcinomu, ale jeho mutace či nadměrnou expresi nacházíme u širokého spektra onkologických onemocnění (karcinom prsu, pankreatu, močového měchýře, nemalobuněčné karcinomy plic atd.). V současné době probíhají experimenty zaměřené na reaktivaci GTPázové aktivity p21^{RAS} mutantů a možnosti genové terapie při ztrátě GAP regulátorů (**www.infobiogen.fr; Ford et al., 1997; Rosypal, 1997; Przybojewska et al., 2000**).

2.2.7. Protoonkogen BCL-2

Protein genu BCL-2 (B-cell Leukemia/Lymphoma 2; 18q21) specificky blokuje apoptózu. BCL-2 je široce exprimován během embryonálního vývoje a v dospělosti je jeho přítomnost omezena na populace kmenových a prekursorových buněk. BCL-2 protoonkogen patří do rodiny příbuzných proteinů, z nichž některé (BCL-2, BCLX_L, MCL1) apoptózu suprimují, zatímco jiné (BAX, BCLX_s) jsou proapoptické. BCL-2 protein dimerizuje s proteinem BAX, který zároveň vytváří homodimery BAX-BAX. Zatímco BAX-BAX homodimer působí jako induktor apoptózy, dimer BCL-2/BAX apoptózu inhibuje. BCL-2 i

BAX jsou transkripčními cíly pro tumor-supresorový protein p53 a důležitým poznatkem je i to, že exprese pro-apoptického proteinu BAX může být indukována γ -zářením, chemoterapeutiky či jiným genotoxickým stresem (**Basu et al., 1998**). BCL-2 se často účastní translokace t(14;18)(q32;21), při které se BCL-2 gen dostává pod kontrolu promotorů pro imunoglobulinový gen IgH a je kontinuálně exprimován. Tato translokace je často nacházena u B-buněčných malignit, a to až u 80-90% folikulárních lymfomů a u 30% difuzních velkobuněčných lymfomů. Vyšší expresi BCL-2 nacházíme u různých typů malignit, jako je například karcinom prsu a prostaty, u nádorů kolorekta, plic, žaludku či u neuroblastomu (**Simpson et al., 1997; Ramalingam et al., 1997**). Z klinického hlediska je zajímavé, že u karcinomu prsu je exprese BCL-2 (narozdíl od BAX) závislá na estrogenech, což nabízí možnost použití anti-estrogenové léčby. Všeobecně agresivnější typy karcinomu prsu, které jsou hormonálně independentní jsou i BCL-2 negativní. Překvapivé je to, že u BCL-2 pozitivních pacientek s pozitivními estrogenovými receptory (ER) byla zaznamenána delší doba přežití bez příznaku nemoci, než u pacientek s BCL-2 negativními tumory. Obdobně, pacientky s BCL-2 pozitivními karcinomy ovária dosahovaly v léčbě lepších výsledků, než pacientky s p53 pozitivními a BCL-2 negativními tumory. Částečnou odpověď na tento problém dává pozorování, že u BCL-2 negativních nádorů dochází i ke snížení exprese BAX genu (**Basu et al., 1998**). Také například studie Coxe G. et al. (2001) prokázala, že přítomnost BCL-2 proteinu je asociována s dobrou prognózou u nemalobuněčného karcinomu plic. Naopak autor jiné publikace (**Reed et al., 1995**) se přiklání k názoru, že vyšší hladina BCL-2 proteinu je prediktorem špatné odpovědi na léčbu, rychlejšího relapsu a kratší doby přežití, ale připouští i možnost, že dobrá prognóza u pacientek s BCL-2 pozitivními karcinomy prsu může být založena na nedostatečných informacích o expresi jiných genů z BCL-2 rodiny.

BCL-2 má tedy nesporně antiapoptické účinky, zřejmě však působí jako součást celého soukolí BCL-2 rodiny proteinů a jeho použití jako prognostického faktoru je zatím kontroverzní. Z hlediska aplikace BCL-2 jako prediktoru odpovědi na chemoterapii stojí za zmínku studie Mottolese et al. (2000), ve které byla popsána rezistence nádorových buněk s vyšší hladinou BCL-2 proteinu k léčbě antracykliny.

2.2.2.8. Další cytogenetické prediktory odpovědi nádoru na léčbu

V klinické onkologii existuje mnoho dalších specifických markerů, například za prediktivní faktor je též považována alelická ztráta q raménka chromozomu 18 u pacientů s nádorem kolorekta. Frekvence výskytu této ztráty je vyšší u pacientů ve III. stádiu onemocnění a nehraje zde významnou roli. Naproti tomu ztráta q raménka chromozomu 18 u pacientů ve II stádiu onemocnění je prognosticky nepříznivá a v podstatě znamená doporučení k adjuvantní léčbě levamisolem a fluorouracilem (**Jen et al., 1994**). Pro pacienty s karcinodem prostaty je například důležitý status genu pro androgenní receptor (AR). Během vývoje a růstu je nádor prostaty silně dependentní na androgenech. Při amplifikaci AR genu je významně

snížená farmakologická účinnost antiandrogenů, neboť nádorové buňky overexprimují AR a jsou tak schopny „vychytávat“ i reziduální androgeny. U těchto pacientů se doporučuje provedení totální blokady kastrací (**Koivisto et al., 1996; Palmberg et al., 2000**).

2.3.Závěr

Nádorová onemocnění tvoří z hlediska cytogenetiky, molekulární biologie i medicíny velmi širokou škálu defektů, a to jak celek, tak u jednotlivých diagnóz či pacientů. Z tohoto důvodu je nutno přistupovat k léčbě pacienta velmi individuálně a komplexně. Jsou vyvíjeny nové typy léčiv a současný onkologický výzkum není již založen jen na čistém empirickém zkoušení účinků těchto látek, nýbrž se snaží nalézt terapeutika a nové způsoby léčby, které cíleně působí proti produktům jednotlivých onkogenů, napodobují aktivitu nefunkčních tumor-supresorových proteinů anebo jinak zasahují do buněčného cyklu a působí cíleně na nádorovou buňku. Nicméně v případě použití těchto látek je nutné selektovat pacienty, pro které je daný léčebný režim nejefektivnější. Pro tyto účely jsou intenzivně hledány molekulárně-biologicko-cytogenetické znaky, na jejichž základě by mohl klinický lékař určit pro pacienta co nejindividuálnější a tím i nejúčinnější léčebný režim. A právě mezi tyto markery náleží i status jednotlivých protoonkogenů (tumor-supresorových genů) a jejich proteinů. Snad nejznámějším příkladem je protoonkogen Her-2/neu, jehož amplifikace predikuje dobrou odpověď na antracykliny a předurčuje pacienta k léčbě monoklonální protilátkou - Herceptinem. Nezbyvá jen doufat, že takovýchto prediktorů bude v blízké budoucnosti dostatek a že podstatně zefektivní i zkvalitní léčbu onkologických pacientů.

Poděkování

Práce byla podpořena granty MŠMT J14/98 151100001, IGA MZCR 7506-3, IGA MZCR 7496-3 a Nadací pro výzkum rakoviny v Olomouci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, Wehage S, Jen J, Sidransky D: *Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using oligonucleotide probe array*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 7382-7387.

Alexiev BA, Bassarova A, Popovska SL, Popov AA, Christov CZ: *Expression of c-erbB-2 oncogene and p53 tumor suppressor gene in benign and malignant breast tissue: Correlation with proliferative activity and prognostic index*. Gen Diagn Pathol 1997; 142(5-6): 271-279.

Arango D, Corner GA, Wadler S, Catalano PJ, Augenlicht LH: *C-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo*. *Cancer Res* 2001; 61: 4910-4915.

Ariga N, Moriya T, Suzuki T, Kimura M, Ohuchi N, Sasano H: *Retinoic acid receptor and retinoid X receptor in ductal carcinoma in situ and intraductal proliferative lesions of the human breast*. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91(11):1169-1176.

Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Shulte HM: *Inhibition of mineralocorticoid receptor function by the heat shock protein 90-binding agent geldanamycin*. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 131(2): 233-240.

Baselga J, Norton L, Albanell J, et al: *Recombinant humanized anti-Her2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against Her-2/neu overexpressing human breast cancer xenografts*. *Cancer Res* 1998; 58: 2825-2831.

Baselga J, Seidman A, Rosen PP, Norton L: *HER2 overexpression and paclitaxel sensitivity in breast cancer: Therapeutic implications*. *Oncology* 1997; 11(3) suppl. 2: 43-48.

Basu A, Haldar S: *The relationship between bcl2, bax and p53: Consequences for cell cycle progression and cell death*. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1099-1109.

Bates S, Peters G: *Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene*. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 73-82.

Belkov VM, Krynetski EY, et al.: *Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation*. *Blood* 1999; 93 (5): 1643-1650.

Bennett MR: *Mechanisms of p53-induced apoptosis*. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 1089-1095.

Berns EMJJ, Klijn JGM, van Putten WLJ, van Staveren IL, Portengen H, Foekens JA: *C-myc amplification is a better prognostic factor than Her-2/neu amplification in primary breast cancer*. *Cancer Res* 1992; 52: 1107-1113.

Biroccio A, Banassi B, Amodei S, Gabellini C, et al.: *C-myc down-regulation increases susceptibility to cisplatin through reactive oxygen species-mediated apoptosis in M14 human melanoma cells*. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 174-182.

Bonilla M, Ramirez M, Lopez-Cueto J, Kariglio P: *In vivo amplification and rearrangements of c-myc oncogene in human breast tumors*. *J Natl Cancer Inst* 1988; 15: 665-670.

Bouchard C, Staller P, Eilers M: *Control of cell proliferation by Myc*. *Trends Cell Biol* 1998; 8 (5): 202-206.

Bullock AN, Fersht AR: *Rescuing the function of mutant p53*. *Nature Rev Cancer* 2001; 1: 68-76.

Casalini P, Botta L, Ménard S: *Role of p53 in HER2-induced proliferation or apoptosis*. *J Biol Chem* 2001; 276(15): 12449-1253.

Cinelli M, Magnelli L, Chiarugi V: *Redundant down-regulation pathways for p53*. Pharmacol Res 1998; 37: 83-85.

Cline MJ, Battifora H, Yokota J: *Proto-oncogene abnormalities in human breast cancer: correlation with anatomic features and clinical course of disease*. J Clin Oncol 1987; 5: 999-1006.

Conway RM, Madigan MC, Billson FA, Penfold PL: *Vincristine- and cisplatin-induced apoptosis in human retinoblastoma. Potentiation by sodium butyrate*. Eur J Cancer 1998; 34(11): 1741-1748.

Courjal F, Louason G, Speiser P, Katsaros D, Zeillinger R, Theillet C: *Cyclin gene amplification and overexpression in breast cancer and ovarian cancers: Evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors*. Int J Cancer 1996; 69: 247-253.

Cox G, Jones JL, Andi A, Abrams KR, O'Bryan KJ: *Bcl-2 is an independent prognostic factor and adds to a biological model for predicting outcome in operable non-small cell lung cancer*. Lung Cancer 2001; 34: 417-426.

Černáková I: *Farebná cytogenetika: Metódy a ich využitie v diagnostike chromozómových aberácií*. Lek Obz 2000; 49(12): 383-384.

Dang CV, Reasar LMS, Emison E, Kim S, Li Q, Prescott JE, Wonsey D, Zeller K: *Function of the C-myc oncogenic transcription factor*. Exp Cell Res 1999; 253: 63-77.

Fernandes D, Guida E, Koutsoubos V, Harris T, Vadiveloo P, et al.: *Glucocorticoids inhibit proliferation, Cyclin D1 expression, and retinoblastoma protein phosphorylation, but not activity of the extracellular-regulated kinases in human cultured airway smooth muscle*. Am J Respir Cell Mol Biol 1999; 21: 77-88.

Fink-Puches R, Pilarski P, Schmidbauer U, Kerl H, Soyer HP: *No evidence for c-erbB-2 overexpression in cutaneous melanoma*. Anticancer Res 2001; 21(4A): 2793-2795.

Ford IM, Ford CHJ: *Molecular Biology of Cancer*. BIOS Scientific Publishers Limited, 1997, Oxford, United Kingdom.

Gao C, Zou Z, Xu L, Moul J, Seth P, Srivastava S: *P53- dependent induction of heat shock protein 27 (hsp27) expression*. Int J Cancer 2000; 88: 191-194.

Gewirtz DA, Randolph JK, Chawla J, Orr MS, Fornari FA: *Induction of DNA damage, inhibition of DNA synthesis and suppression of c-myc expression by the anthracycline analog, idarubicin (4-demethoxy-daunorubicin) in the MCF-7 breast tumor cell line*. Cancer Chemother Pharmacol 1998; 41: 361-369.

Gianni L, Capri G, Mezzelani A, et al.: *Her-2/neu amplification and response to doxorubicin / paclitaxel (A/T) in women with metastatic breast cancer*. 35th Annual ACSO Meeting, 1999.

Gianni L, Capri G., Valagussa P, et al.: *Putting taxans to work in operable breast cancer: a search for selective indications from empirical studies*. Recent Results Cancer Res 1998; 152: 314-322.

Gotlieb WH, Goldberg I, Weisz B, Davidson B, Novikov I, Kopolovic J, Ben-Brauch G: *Topoisomerase II immunostaining as a prognostic marker for survival in ovarian cancer*. Gynecol Oncol 2001; 82: 99-104.

Grant S: *Ara-C: cellular and molecular pharmacology*. Adv Cancer Res 1998; 72: 197-233.

Gupta D, Holden J, Layfield L: *Topoisomerase II alpha, retinoblastoma gene product, and p53: Potential relationship with aggressive behavior and malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis*. Appl Immunohistochem Molecul Morphol 2001; 9(1): 86-91.

Hande KR: *Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II*. Biochim Biophys Acta 1998; 1400 (1-3): 173-184.

Heim S., Mitelman F.: *Cancer cytogenetic; Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells*, A John Wiley and sons, Inc. press, New York 1995, Second edition.

Herceptin (Trastuzumab) anti Her-2 monoclonal antibody targeted to increase survival. Roche, ECCO 2001, 21-25 October, Lisbon, Portugal.

Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Kasugai T, Ishiguro S, Takami K, Nakayama T, Nishisho I: *MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation*. Br J Cancer 1997; 75(9): 1302-1308.

Hochhauser D, Schnieders B, Erickan-Abali E, Gorlic R, et al.: *Effects of Cyclin D1 overexpression on drug sensitivity in human fibrosarcoma cell line*. J Natl Cancer Inst 1996; 88(18): 1269-1275.

Charron M, Hancock R: *RNA topoisomerase II is required for information of mitotic chromosomes in Chinese hamster ovary cells: studies using the inhibitor 4'-demethylepipodophyllotoxin 9-(4.6-O-thenylidene-beta-D-glucopyranoside)*. Biochemistry 1990; 29: 9531-9537.

Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ: *Comparision of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of Her-2/neu in breast cancer*. J Clin Oncol 1999; 17 (7): 1974-1982.

Jardines L, Weiss M, Fowble M, Greene M: *Neu(c-erbB-2/Her2) and the epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer*. Pathobiology 1993; 61: 268-282.

Jarošová M, Holzerová M, Jedličková K, Mihál V, Zuna J, Starý J, Pospíšilová D, Zemanová Z, Trka J, Blažek J, Pikalová Z, Indrák K: *Importance of using comparative genomic hybridisation to improve detection of chromosomal changes in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Genet Cytogenet 2000; 123: 114-122.

Jarošová M: *Cytogenetika*. Pages 78-89 in: Mayer J, Starý et al. (editors): *Leukemie*. Grada Publishing 2002, Praha.

Järvinen TAH., Tanner M, Rantanen V, Bärlund M, Borg A, Grénman S, Isola J: *Amlification and deletion of Topoisomerase II α associate with ErbB-2 amlification and affect sensitivity to Topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer*. Am J Pathol 2000; 156: 839-847.

Jen J, Hoguen K, et al.: *Allelic Loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer*. N Eng J Med 1994; 331 (4): 213-221.

Keith WN, Douglas F, Wishart GC, McCallum HM, George WD, Kaye SB, Brown R: *Co-amplification of erbB2, topoisomerase II α and retinoic acid receptor α genes in breast cancer and allelic loss of topoisomerase I on chromosome 20*. Eur J Cancer 1993; 29A(10): 1469-1475.

Keith WN, Tan KB, Brown R: *Amplification of the topoisomerase II alpha gene in a non-small cell lung cancer cell line and characterisation of polymorphisms at the human topoisomerase II alpha and beta loci in normal tissue*. Genes Chromosomes. Cancer 1992; 4: 169-175.

Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Osaki A, Toge T: *The role of HER-2 oncoprotein in drug-sensitivity in breast cancer*. Oncol Rep 2002; 9(1): 3-9.

Klener P: *Klinická onkologie*. Nakladatelství Galén 2002, Praha.

Klijn JGM, Berns EMJJ, Foekens JA: *Prognostic factors and response to therapy in breast cancer*. Cancer Surv 1993; 18: 165-197.

Koivisto P, Visakorpi T, et al.: *Androgen receptor gene amplification: a novel molecular mechanism for endocrine therapy resistance in human prostate cancer*. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1996; 226: 57-63.

Kotelnikov VM, Coon JS, Mundle S, Kelanic S, La Follette S, Taylor SIV, Hutchinson J, Panje W, Caldarelli DD, Preisler HD: *Cyclin D1 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck and in oral mucosa in relation to proliferation and apoptosis*. Clin Cancer Res 1997; 3(1): 95-101.

Krainer M, Brodowicz T, Zeillinger R, Wiltschke C: *Tissue expression and serum levels of Her-2/neu in patients with breast cancer*. Oncology 1997; 54: 475-481.

Kusumakumary P, Vats TS, et al.: *Malignancies in Down syndrome*. Indian J Pediatr 1997; 64 (6): 873-8.

Lax SA, Chia MC, Busson P, Klamut HJ, Lu FF: *Adenovirus-p53 gene therapy in human nasopharyngeal carcinoma xenografts*. Radiother Oncol 2001; 61: 309-312.

Lee CM, Reddy EP: *The v-myc oncogene*. Oncogene 1999; 18: 2997-3003.

Lichy JH, Dalbergue F, Washington C, et al: *Genetic heterogeneity in ductal carcinoma of the breast*. Lab Invest 2000; 80(3): 291-301.

Lynch BJ, Guinee DG, Holden JA: *Human DNA Topoisomerase II-Alpha: A new marker of cell proliferation in invasive breast cancer*. Hum Pathol 1997; 28: 1180-1188.

Mamay CL, Schauer IE, Rice PL, Dwyer-Nield LD, You M, Sclafani RA, Malkinson AM: *Cyclin D1 as a proliferative marker regulating retinoblastoma phosphorylation in mouse lung epithelial cells*. Cancer Lett 2001; 168 (2): 165-172.

Mark HFL, Feldman D, Das S, Kye H, Mark S, Sun CL: *Fluorescence in situ hybridization study of HER-2/neu oncogene amplification in prostate cancer*. Exp Mol Pathol 1999; 66: 170-178.

Mihál V a kol: *Akutní lymfoblastická leukémie*, str. 38-45 ve *Vybrané kapitoly z pediatrie II*, Vydavatelství University Palackého 2000, Olomouc.

Mihál V, Hajdúch M, Janošťáková A, Šafářová M, Nosková V, Pospíšilová D, Novák Z: *Application of in vitro of drug resistance assays in treatment of childhood leukemia*. *Klin Onkol* 2000, zvláštní číslo; 2: 39-42.

Mihál V, Hajdúch M, Nosková V, et al.: *Analysis of correlation between drug resistance and clinical/laboratory measures found in a group of children with ALL treated by ALL-BFM 90 protocol*. *Electronic Journal of Oncology* 1999; 1: 1-14. (http://ejo.univ-lyon1.fr/archivage/escrpts/1999_1_80-89/escrpt)

Michalová K: *Úvod do lidské cytogenetiky*. Vydavatelství Institutu pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, 1999: 123-126.

Miller CW, Yeon C, Aslo A, Mendoza S, Aytac U, Koeffler HP: *The p19INK4D cyclin dependent kinase inhibitor gene is altered in osteosarcoma*. *Oncogene* 1997; 15(2): 231-235.

Mottolese M, Benevolo M et al.: *Role of p53 and Bcl-2 in high-risk breast patients treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy*. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 722-729.

Moudgil VK, Dinda S, Khattree N, Jhanwar S, Alban P, Hurd C: *Hormonal regulation of tumor suppressor proteins in breast cancer cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 76: 105-117.

Murphy DS, McHardy P, Coutts J, Mallon EA, George WD, Kaye SB, Brown R, Keith WN: *Interphase cytogenetic analysis of erbB2 and topoII α co-amplification in invasive breast cancer and polysomy of chromosome 17 in ductal carcinoma in situ*. *Int J Cancer* 1995; 64: 18-26.

Nasir L, Rutteman GR, Reid SW, Schulze C, Argyle DJ: *Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine soft-tissue sarcomas*. *Cancer Lett* 2001; 174(1): 83-89.

Nass SJ, Dickson RB: *Defining a role for c-myc in breast tumorigenesis*. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 44 (1): 1-22.

Nosková V, Džubák P, Kuzmina G, Ludková A, Stehlík D, Šafářová M, Janošťáková A, Kořínková G, Mihál V, Hajdúch M: *In vitro chemoresistance profile and expression/ function of MDR associated proteins in resistant cell lines derived from CCRF-CEM, K562, A549 and MDA MB 231*. *Neoplasma* 2002 (submitted).

Nosková V, Hajdúch M, Mihál V, Ciertka K: *Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi: typická MDR*. *Klin.Onkol* 2000; 2: 4-9. [a]

Nosková V, Hajdúch M, Mihál V, Ciertka K: *Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi: atypická MDR*. *Klin.Onkol* 2000; 2: 10-14. [b]

Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, Wolmark N: *HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15*. J Natl Cancer Inst 2000; 92(24): 1991-1998.

Palmberg C, Koivisto P, et al.: *Androgen receptor gene amplification at primary progression predict response to combined androgen blockade as second line therapy for advanced prostate cancer*. J Urol 2000; 164 (6): 1992-1995.

Pavlová Š, Mayer J, Šmardová J: *Detekce a analýza teplotně senzitivních mutací nádorového supresoru p53 u akutní myeloidní leukemie metodou FASAY*. Brněnské onkologické dny, 29.5-31.5.2002, Brno, Edukační sborník.

Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, et al.: *The effect of Her-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells*. Oncogene 1997; 15: 537-547.

Pegram MD, Lipton A, Hayes DF: *Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185Her-2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with Her-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment*. J Clin Oncol 1998; 6(8): 2659-2671.

Pendergast GC: *Mechanisms of apoptosis by c-myc*. Oncogene 1999; 18:2967-2987.

Peoples GE, Goedegebuure PS, Smith R, Linehan DC: *Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T-lymphocytes recognize the same Her-2/neu-derived peptide*. Immunology 1995; 92: 432-436.

Perez EA: *Her2 as a prognostic, predictive, and therapeutic target in breast cancer*, JMCC 1999; 6: 233-240.

Perry CM, Wiseman LR: *Trastuzumab (new drug profile)*. BioDrugs 1999; 12: 129-135.

Persons DL, Arber DA, Sosman JA, Borelli KA, Slovak ML: *Amplification and overexpression of Her-2/neu are uncommon in advanced stage melanoma*. Anticancer Res 2000; 20(3B): 1965-1968.

Pettitt AR, Clarke AR, Cawley JC, Griffiths SD: *Purine analogues kill resting lymphocytes by p53-dependent and -independent mechanisms*. Br J Haematol 1999; 105(4): 986-988.

Pettitt AR, Sherrington PD, Cawley JC: *The effect of p53 dysfunction on purine analog cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia*. Br J Haematol 1999; 106(4): 1049-1051.

Przybojewska B, Jagiello A, Jalmuzna P: *H-Ras, K-Ras, and N-Ras gene activation in human bladder cancers*. Cancer Genet Cytogenet 2000; 121: 73-77.

Ramalingam A, Hirai A, Thompson EA: *Glucocorticoid inhibition of fibroblast proliferation of the cyclin kinase inhibitor p21^{cip1}*. Mol Endocrinol 1997; 11(5): 577-586.

Reed JC: *Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance*. Curr Opin Oncol 1995; 7: 541-546.

Reisman D, Loging WT: *Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene*. Semin Cancer Biol 1998; 8: 317-324.

Ross JS, Fletcher JA: *The Her-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy*. Stem Cells 1998; 16: 413-428.

Rosypal S: *Úvod do molekulární biologie*. GRAFEX tisk, 1997, Blansko, druhé rozšířené vydání.

Shapiro GI, Wade HJ: *Anticancer drug target: cell cycle and checkpoint control*. J Clin Invest 1999; 104:1645-1653.

Sherr CI: *Cancer cell cycles*. Science 1996; 274: 1672-1+677.

Shimizu T, Pommier Y: *DNA fragmentation induced by protease activation in p53-null human leukemia HL60 cells undergoing apoptosis following treatment with the topoisomerase I inhibitor camptothecin: cell-free system studies*. Exp Cell Res 1996; 226: 292-301.

Schmidt EV: *The role of c-myc in cellular growth control*. Oncogene 1999; 18: 2988-2996.

Simpson JF, Quan DE, O'Malley F, Odom-Maryon T, Clarke PE: *Amplification of CCND1 and expression of its protein product, cyclin D1, in ductal carcinoma in situ of the breast*. Am J Pathol 1997; 151(1): 161-168.

Smith CA, Pollice AA, Gu LP, Brown KA, Singh SG, Janocko LE, Johnson R, Julian T, Hyams D, et al.: *Correlations among p53, Her-2/neu, and ras overexpression and aneuploidy by multiparameter flow cytometry in human breast cancer: evidence for a common phenotypic evolutionary pattern in infiltrating ductal carcinomas*. Clin Cancer Res 2000; 6: 112-126.

Smith K, Houlbrook S, Greenall M, Carmichael J, Harris AL: *Topoisomerase II α co-amplification with erbB2 in human primary breast cancer cell lines: relationship to m-AMSA and mitoxantrone sensitivity*. Oncogene 1993; 8: 933-938.

Sparano J: *New insights into local-regional breast cancer therapy*. 35th Annual ACSO Meeting, 1999.

Steiner JH, Nason-Burchenal K, Osborne MP, Telang NT: *Preventive efficacy of receptor class selective retinoids on Her-2/neu oncogene expressing preneoplastic human mammary epithelial cells*. Int J Oncol 2002; 21(1): 127-134.

Strachan T, Read AP: *Human Molecular Genetics*. BIOS Scientific Publishers Ltd., 1999, Oxford, UK.

Tahara H, Smith AP, Gaz RD, Zariwala M, Xiong Y, Arnold A: *Parathyroid tumor suppressor on 1p: Analysis of the p18 cyclin-dependent kinase inhibitor gene as a candidate*. J Bone Miner Res 1997; 12(9): 1330-1334.

Takashi A, Hiroshi A, Chiyoko U, Noboru Y, Yoshitomo M, Akira S, et al.: *Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-myc/immunoglobulin heavy chain fusion*. J Clin Oncol 2000; 18(3): 510-518.

Terada Y, Inoshita S, Nakashima O, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F: *Regulation of Cyclin D1 expression and cell cycle progression by mitogen-activated protein kinase cascade*. *Kidney international* 1999; 56: 1258-1261.

Terada Y, Okado T, Inoshita S, Hanada S, Kuwahara M, Sasaki S, et al.: *Glucocorticoids stimulate p21^{CIP1} in mesangial cells and in anti-GMB glomerulonephritis*. *Kidney Int* 2001; 59: 1706-1716.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Kelsey AM, Birch JM: *Significance of intron 6 sequence variations in the TP53 gene in Li-Fraumeni syndrome*. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 129: 85-87.

Varley JM, Swallow JE, Brammar WJ, Whittaker JL, Walker RA: *Alterations to either c-erbB-2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with short-term prognosis*. *Oncogene* 1987; 1: 423-430.

Veselý J, Chmela Z, Kryštof V, Hanuš J, Hajdúch M, Strnad M, Havlíček L: *Regulace buněčného cyklu cyklin-dependentními kinázami*. *Zprav klin farmakol farmac* 1998; 12(1-2): 6-10.

Vorlíček J, Vyzula R, Adam T, et al: *Farmakologie nejčastěji používaných cytostatik*, str. 77-167 v *Praktická onkologie – vybrané kapitoly*. Grada Publishing s.r.o., Praha 2000.

www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/Geneliste.html (Centre de Ressources INFOBIOGEN, 2002).

Weidner U, Peter S, Strohmeyer T: *Inverse relationship of epidermal growth factor receptor and Her-2/neu gene expression in human renal cell carcinoma*. *Cancer Res* 1990; 50: 4504-4509.

Wilson CS, Medeiros LJ, Lai R, et al: *DNA topoisomerase II α in multiple myeloma: A marker of cell proliferation and not drug resistance*. *Mod Pathol* 2001; 14(9): 886-891.

Yamanaka Y, Fries H, Kobrin MS, Büchler M, Kunz J, Beger HG, Korc M: *Overexpression of Her2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma*. *Hum Pathol* 1993; 24:1127-1134.

Yamazaki K, Isobe H, Hanada T, Betsuyaku T, Hasegawa A, Hizawa N, Ogura S, Kawakami Y: *Topoisomerase II alpha content and Topoisomerase II catalytic activity cannot explain drug sensitivities to topoisomerase II inhibitors in lung cancer cell lines*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 39(3); 192-198.

Yang L, Munoz-Medellin D, Kim HT, Ostrowski J, Reczek P, Brown PH: *Retinoic acid receptor antagonist BMS453 inhibits the growth of normal and malignant breast cells without activating RAR-dependent gene expression*. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 56(3):277-291.