

Abstrakt

Testikulární germinální nádory (TGN) jsou poměrně vzácné solidní nádory dospělých. I tak postihují více než 700 mužů ročně v ČR, přičemž se většinou jedná o mladé pacienty ve věku 18-45 let. Velká část pacientů je vyléčitelná kombinací operace a chemoterapie, přesto zhruba 50 mužů ročně v ČR tomuto nádoru podlehnou, a to v naprosté většině případů následkem rozvoje rezistence na chemoterapii obsahující cisplatinu. Méně častý výskyt a vysoká kurabilita jsou patrně příčinou toho, že molekulárně biologické i klinické studie se u těchto nádorů provádějí relativně zřídka, a naše porozumění biologickým procesům vedoucím ke vzniku primárního nádoru a vývoji rezistence na cisplatinu (CDDP) je stále omezené. V současné době se v klinické praxi nepoužívají žádné specifické molekulárně-biologické vlastnosti TGN, které by mohly sloužit jako prognostické nebo prediktivní faktory a přispět k lepší stratifikaci pacientů a personalizaci léčby. V této práci jsme studovali molekulárně-genetické pozadí vývoje TGN a rezistence na CDDP na několika úrovních. Za účelem komplexního studia vzniku cisplatinové rezistence jsme se rozhodli připravit a sekvenovat CDDP-exponované TGN buněčné linie. Dlouhodobá expozice CDDP zvýšila rezistenci 10krát v buněčné linii NCCIT, zatímco u Tera-2 nebyla dosažena významná rezistence. Vývoj rezistence na CDDP byl doprovázen přechodným poklesem proliferace a změnami v buněčném cyklu - zvýšení G1 a snížení S-fракce v buněčné populaci. CDDP-rezistentní buňky NCCIT vykazovaly více získaných mutací (celkem 21, z toho 3 v genu *ATRX*), stejně tak i významné změny v genové expresi (např. *PAX5*). Analýza variací v počtu kopií (CNV - copy number variations) ukázala větší ztráty v počtech kopií více genů a několik duplikací v buňkách rezistentních na CDDP. Dále jsme u TGN zkoumali význam genu Wilmsova tumoru 1 (*WT1*), jelikož se jedná o transkripční faktor nezbytný pro vývoj a funkci varlat a jeho změny byly popsány v souvislosti s různými jinými malignitami, takže jsme předpokládali jeho potenciální roli i v patogenezi TGN. Kvantifikací celkové exprese *WT1* pomocí qPCR a jeho hlavních izoform u 105 TGN pacientů (114 nádorových vzorků a 100 kontrol) jsme prokázali významné snížení exprese *WT1* se signifikantním posunem k izoformám postrádajícím exon 5, které spolu s relativně vysokým výskytem *WT1* somatických mutací identifikují *WT1* jako nový potenciální faktor zapojený do patogeneze TGN, pravděpodobně jako tumor supresorový gen. U dalších 210 pacientů s TGN byla metodou qPCR detekována mutace *BRAF* V600E a tato byla identifikována pouze u 1 % pacientů, což nnesvědčí pro její význam ve vývoji TGN. Exprese proteinu p53 byla hodnocena imunohistochemicky, což ukázalo významné snížení exprese v metastázách ve

srovnání s původními nádory. Tyto výsledky mohou nasvědčovat roli p53 v metastatickém šíření u TGN. Naše práce dále zahrnuje sekvenční data z 31 vzorků primárních nádorů pacientů a párových kontrol. Zde byly nalezeny významné aberace více genů, přičemž nejvyšší počet mutací byl pozorován u pacientů, u kterých se vyvinula rezistence na CDDP. Jako zajímavou hodnotíme skutečnost, že u 2 pacientů byla detekována mutace v genu *ATRX*. Byly nalezeny i aberace ve vybraných genech při amplikonovém sekvenování, které mohou být důležité v biologii TGN - *TP53*, *MDM2*, *ATM*. Hodnotily se také *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *BRAF* a *WT1*. Náš výzkum zdůrazňuje molekulární změny související s vývojem rezistence na cisplatinu a identifikuje geny s potenciálními rolmi v tomto procesu.