

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Preventivní medicína



MUDr. Beatrice Mohelníková Duchoňová

***Sledování genetických faktorů ovlivňujících riziko vzniku a průběh karcinomů
kolorekta a pankreatu.***

***Study of genetic factors modifying the risk of onset and progression of
colorectal and pancreatic cancer***

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Pavel Souček, CSc.
Laboratoře toxikogenomiky, Státní zdravotní ústav v Praze

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 01.02.2012

Beatrice Mohelníková Duchoňová

Beatrice Mohelníková Duchoňová

Identifikační záznam:

MOHELNÍKOVÁ DUCHOŇOVÁ, Beatrice. *Sledování genetických faktorů ovlivňujících riziko vzniku a průběhu karcinomů kolorekta a pankreatu. [Study of genetic factors modifying the risk of onset and progression of colorectal and pancreatic cancer]*. Praha, 2012. 111 stran, 11 příloh. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Pavel Souček CSc.

Abstrakt

Úvod: Cílem této práce bylo sledování genetických faktorů ovlivňujících riziko vzniku a průběh karcinomů kolorekta a pankreatu. První část se zabývá etiologickými faktory, a to vlivem polymorfismů v biotransformačních enzymech a genetických alterací v genu *CHEK2* na vznik těchto malignit. V druhé části jsou analyzovány geny transportu cytostatik jako případné prognostické a prediktivní markery odpovědi na onkologickou léčbu. **Materiály a metody:** Polymorfismy a další genetické alterace byly zjišťovány pomocí real-time PCR, alel-specifické PCR a PCR-RFLP metody v DNA získané z krve pacientů. Byla hodnocena frekvence polymorfismů a posuzován jejich význam s ohledem na dostupná epidemiologická data. Expresí genů byly stanoveny metodou qPCR v párových vzorcích tkání nádoru a okolního parenchymu. **Výsledky:** Pro většinu námi sledovaných polymorfismů se nepodařilo prokázat vztah mezi jejich přítomností a rizikem vzniku obou těchto malignit. Variantní alela *CYP2A13*7*, byla nalezena u 7 z 265 hodnocených zdravých kontrol, ale nebyla nalezena u žádného pacienta s karcinomem pankreatu. Výskyt variantní alely *GSTP1-Val* a genotypu *GSTT1-null* byl naopak spojen se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu pankreatu (OR=2,38; 95% CI=1,17- 4,83). V souboru pacientů s kolorektálním karcinomem byl genotyp *GSTT1-null* v kombinaci s *GSTM1-null* genotypem spojen s mírně zvýšeným rizikem (OR=1,58; 95% CI=1,01- 2,47) a samotná delece *GSTM1* zvyšovala riziko kolorektálního karcinomu po zohlednění ostatních sledovaných faktorů (OR=1,30; 95% CI=1,01-1,68). Porovnáním exprese všech 49 členů lidské nadrodiny ABC transportérů u vzorků nádoru pankreatu s okolní nenádorovou tkání pankreatu jsme zjistili, že 11 genů bylo statisticky významně upregulováno a 4 downregulovány ($p < 0,05$) v tkáni adenokarcinomu. Zjištěná zvýšená exprese *ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB4*, *ABCC1*, *ABCC5* v nádorové tkáni je ve shodě s jejich dříve prokázaným fenotypem mnohočetné lékové rezistence. Downregulace *ABCA3* ($p=0,002$), *ABCA5* ($p=0,010$), *ABCC6* ($p < 0,001$) a *ABCC7* ($p=0,016$) ve tkáni karcinomu pankreatu zatím nebyla publikována. **Závěry:** Naše výsledky ukazují, že polymorfismy v genech kódující biotransformační enzymy mohou ovlivňovat riziko vzniku maligního onemocnění slinivky břišní a tlustého střeva v české populaci. Výsledky pilotní studie zaměřené na expresi ABC transportérů ve tkáni karcinomu pankreatu prokázaly významné rozdíly v hladinách transkriptů těchto membránových enzymů, které jsou klíčové pro transport cytostatik ven z nádorových buněk. Pro potvrzení těchto výsledků jsou však nutné ověřující analýzy na větších souborech pacientů.

Klíčová slova: karcinom, pankreas, tlusté střevo, biotransformace, transport léčiv

Abstract

Introduction: The aim of this study was to evaluate the role of genetic and lifestyle factors in the risk of onset and progression of colorectal and pancreatic cancer. The first part deals with the etiological factors and the importance of polymorphisms in biotransformation enzymes and genetic alterations in the gene *CHEK2* in the origin of these malignancies. In the second part, the ABC transporter genes were analyzed as potential prognostic and predictive markers of a treatment's outcome. **Materials and methods:** The polymorphisms and other genetic alterations were detected using real-time PCR, allele-specific PCR and PCR-RFLP methods in DNA which was extracted from the blood of patients. The frequency of polymorphisms was evaluated and their importance was assessed with regard to the available epidemiological data. Gene expressions were determined by qPCR in paired samples of tumor tissue and adjacent non-tumorous parenchyma. **Results:** A majority of the observed polymorphisms failed to show a relationship between their presence and the risk of any of these malignancies. *CYP2A13* variant allele*7 coding inactive enzyme was found in 7 of 265 controls and in none of 235 pancreatic carcinoma patients. In contrast, *GSTP1*-codon 105 Val variant allele and *GSTT1-null* genotype were associated with an elevated pancreatic cancer risk (OR=1.38; 95%CI=0.96-1.97 and OR=1.56; 95%CI=0.93-2.61, respectively). A combination of *GSTT1-null* and *GSTP1*-codon 105 Val variants further increased the risk of pancreatic cancer (OR=2.50; 95%CI=1.20-5.20). In the group of patients with colorectal cancer, the *GSTT1-null* genotype in combination with the *GSTM1-null* genotype was associated with a slightly increased risk (OR=1.58, 95% CI=1.01-2.47) and the actual deletion of *GSTM1* increased the risk of colorectal cancer after adjusting for other observed factors (OR=1.30, 95% CI=1.01-1.68). By comparing the expression levels of all 49 members of the human ABC transporters in pancreatic tumor samples with nonmalignant pancreatic tissue, we found that 11 genes were significantly upregulated and 4 genes downregulated ($p < 0.05$) in adenocarcinoma tissue. The observed increased expression of *ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB4*, *ABCC1*, *ABCC5* in tumor tissue is consistent with their previously demonstrated multidrug resistance phenotype. Downregulation of *ABCA3* ($p = 0.002$), *ABCA5* ($p = 0.010$), *ABCC6* ($p < 0.001$) and *ABCC7* ($p = 0.016$) in pancreatic cancer tissue has not yet been published. **Conclusions:** Our results indicate that polymorphisms in genes coding for biotransformation enzymes may influence the risk of malignant disease of the pancreas and colon in the Czech population. The results of the pilot study on the expressions of ABC transporters in pancreatic cancer tissues showed significant differences in transcript levels of these membrane proteins that are crucial for the transport of chemotherapeutic agents outside of tumor cells. However, analyses on larger sets of patients are necessary to verify and confirm these results.

Key words: carcinoma, pancreas, colon, biotransformation, drug transport

Obsah

1. TEORETICKÝ ÚVOD	3
1.1. Zhoubné nádory- adenokarcinom pankreatu a kolorektální karcinom	3
1.1.1. Etiologie a rizikové faktory	5
1.1.2. Terapie a prognóza	7
1.2. Biotransformace a biotransformační enzymy	10
1.2.1. Polymorfismy v biotransformačních enzimech 1. fáze biotransformace a vztah k nádorovým onemocněním	11
1.2.2. Polymorfismy v biotransformačních enzimech 2. fáze biotransformace a vztah k nádorovým onemocněním	12
1.2.3. Polymorfismy v enzimech účastnících se metabolismu volných radikálů, oxidační stres a vztah k nádorovým onemocněním.....	13
1.2.4. Membránové transportéry- enzymy 3. fáze biotransformace a vztah k nádorovým onemocněním	15
1.2.4.1. ATP-Binding Cassette (ABC) transportéry	15
1.2.4.2. Nukleosidové transportéry.....	20
1.2.4.3. Erlotinib a ABC Transportéry	22
1.3. Specifika studia genových expresí u karcinomu pankreatu.....	23
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	25
3. MATERIÁL A METODIKA.....	27
3.1. Biologický materiál	27
3.1.1. Vzorky krve pro izolaci DNA z periferních lymfocytů.....	27
3.1.2. Krevní vzorky pacientů s nádorem slinivky břišní	27
3.1.3. Krevní vzorky pacientů s nádorem tlustého střeva a rekta	27
3.1.4. Krevní vzorky kontrolní skupiny.....	28
3.1.5. Vzorky tkáně pro izolaci DNA a RNA z nádorových a nenádorových buněk	28
3.2. Izolace nukleových kyselin	29
3.2.1. Izolace DNA z periferních lymfocytů	29
Fenol/chloroformová extrakce.....	29
Izolace DNA magnetickými partikulami.....	29
3.2.2. Izolace DNA z nádorové a kontrolní nenádorové tkáně.....	30
3.2.3. Izolace RNA z nádorové a kontrolní nenádorové tkáně.....	31
3.2.4. Kontrola kvantity a kvality nukleových kyselin.....	31
Kontrola kvantity a kvality RNA	31
Kontrola kvantity a kvality DNA	34
3.3. Stanovení polymorfismů v genech kódující biotransformační enzymy	35

3.3.1. Stanovení genetických polymorfismů pomocí polymerázové řetězové reakce s následnou analýzou délky restričních fragmentů	35
Genotypování glutation S-transferázy M1	37
Genotypování glutation S-transferáz T1 a P1	38
3.3.3. Statistická analýza	39
3.3.2. Stanovení genetických polymorfismů pomocí Real-Time polymerázové řetězové reakce.	40
3.4. Stanovení mutací v genu CHEK2.....	43
3.5. Relativní kvantifikace míry exprese genů pomocí real-time PCR metody	44
3.5.1. Syntéza cDNA s PCR kontrolou produktů	44
3.5.2. Výběr stabilních referenčních genů	45
Kvantitativní real-time PCR	45
Analýza stability referenčních genů	47
3.5.3. Relativní kvantifikace míry exprese genů ABC a SLC transportérů.....	48
Kvantitativní real-time PCR	48
Analýza míry exprese sledovaných genů	50
4. VÝSLEDKY.....	51
4.1. Charakteristika studované populace	51
4.1.1. Soubor pacientů s karcinomem pankreatu a zdravých kontrol.....	51
4.1.2. Soubor pacientů s kolorektálním karcinomem a zdravých kontrol	52
4.1.3. Soubor pacientů po chirurgické léčbě karcinomu pankreatu.....	54
4.2. Polymorfismy v genech kódujících biotransformační enzymy a riziko vzniku nádorového onemocnění	55
4.2.1. Polymorfismy v genech kódujících biotransformační enzymy a riziko vzniku karcinomu pankreatu	55
4.2.2. Polymorfismy v genech kódující biotransformační enzymy a riziko vzniku kolorektálního karcinomu.....	60
4.3. Úloha alterací genu CHEK2 v etiologii karcinomu kolorekta a pankreatu	62
4.4. Identifikace referenčních genů pro studium tkání karcinomu pankreatu	63
4.4.1. Stanovení kvality a množství RNA	63
4.4.2. Výběr vhodných kandidátních referenčních genů	63
4.4.3. Identifikace referenčních genů	65
4.5. Relativní kvantifikace míry exprese genů ABC a SLC transportérů.....	68
5. DISKUZE.....	71
5.1. Význam polymorfismů v biotransformačních enzimech a alterací v genu CHEK2 pro individuální vnímavost ke karcinomu pankreatu.....	71
5.2. Význam polymorfismů v biotransformačních enzimech pro individuální vnímavost ke kolorektálnímu karcinomu	76

5.3. Identifikace referenčních genů pro qPCR tkání karcinomu pankreatu.....	78
5.4. Expresní studie ABC a SLC transportérů u karcinomu pankreatu	80
6. ZÁVĚRY	83
7. PODĚKOVÁNÍ	86
8. POUŽITÁ LITERATURA	87
8. SEZNAM ZKRATEK	104
9. SEZNAM PŘÍLOH	111

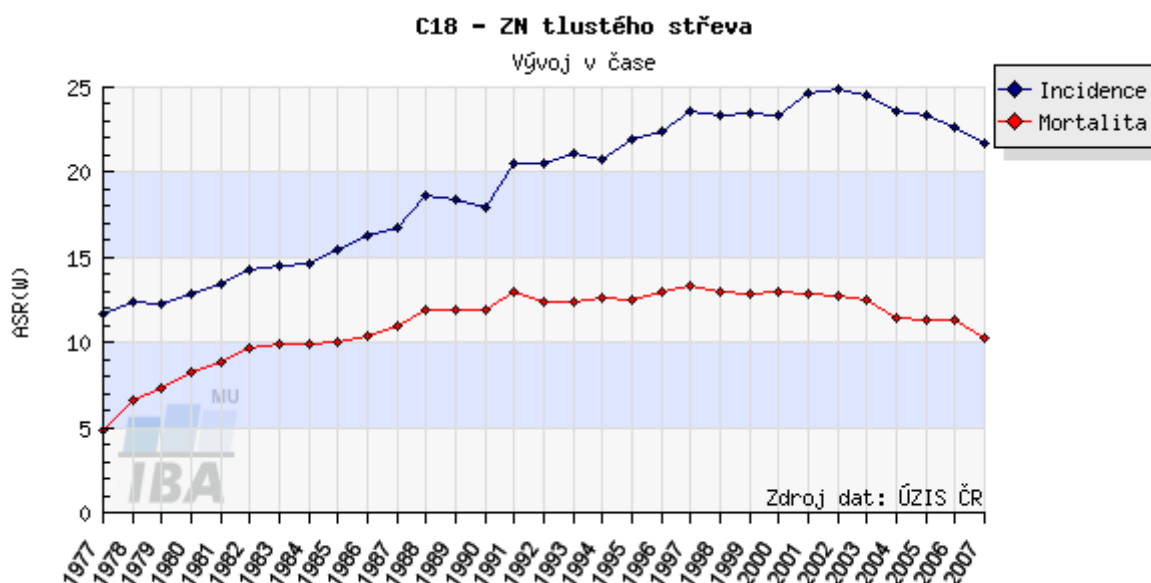
..

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. Zhoubné nádory- adenokarcinom pankreatu a kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC; MKN-10, C.18-C.20) je celosvětově třetím nejčastěji diagnostikovaným zhoubným nádorem. Dle odhadů každoročně touto malignitou onemocní více než 1 000 000 lidí a asi 500 000 zemře [1]. Česká republika se v rámci incidence CRC řadí na druhou příčku v Evropě [2]. V roce 2007 bylo hlášeno 7 826 CRC. Z toho bylo 4 638 případů u mužů (tj. 91,9 případů na 100 tis. mužů) a 3 188 případů u žen (tj. 60,4 případů na 100 tis. žen). To jej u obou pohlaví činí, po vyloučení „jiného zhoubného novotvaru kůže“ (dg. C44), druhou nejčastější onkologickou diagnózou po karcinomu prostaty u mužů a karcinomu prsu u žen. Nejčastěji je novotvar lokalizován v tlustém střevě (dg. C18). Zde se nachází u mužů 55 % zhoubných nádorů, u žen 60 %. Následuje konečník - rektum (dg. C20) a oblast přechodu tlustého střeva v konečník - rektosigmoidální spojení (dg. C19) [3].

Obrázek č. 1: Incidence a mortalita karcinomu tlustého střeva v ČR

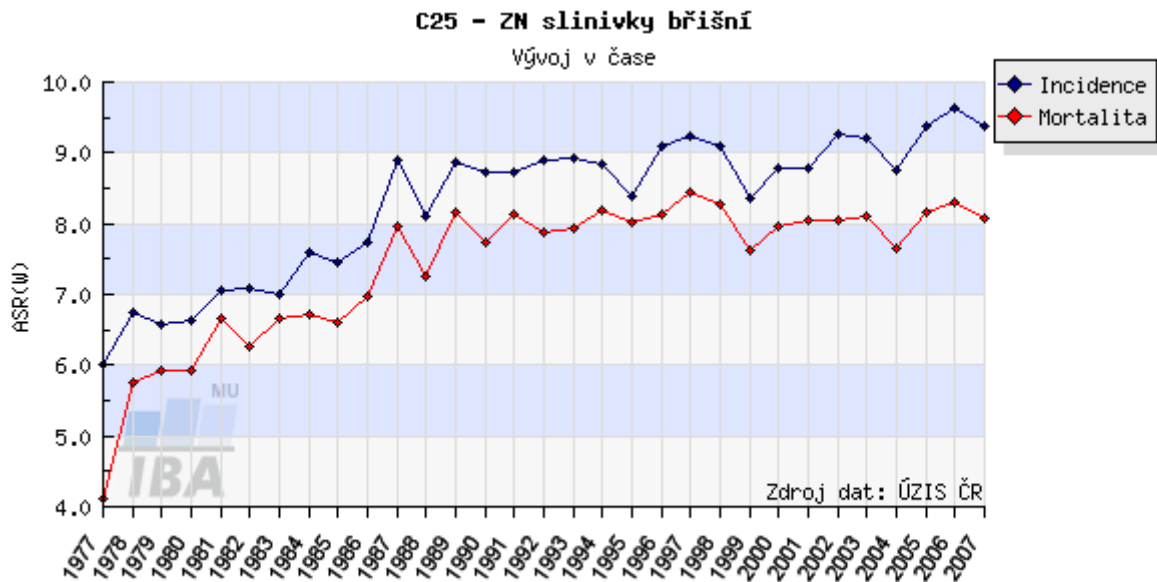


Legenda: Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) pro zvolenou diagnózu v celé populaci. Analyzovaná data: n (incidence)=108 399; n (mortalita)=65 316. Zdroj: <http://www.svod.cz>

Karcinom pankreatu (PanC; MKN-10, C.25) je jednou z nejzávažnějších forem nádorového onemocnění. Dle odhadů American Cancer Society v roce 2008 touto malignitou onemocnělo 37 680 Američanů a 34 290 v témže roce zemřelo, což ji řadí na čtvrtou příčku v příčinách úmrtí na nádorová

onemocnění [4]. V České republice je jak incidence, tak i mortalita karcinomu pankreatu nejen srovnatelná se zahraničím (1926 nových případů a 1781 úmrtí na C25.0 v roce 2007 dle UZIS-3), ale dokonce se řadíme k zemím s nejvyšší incidencí novotvaru slinivky břišní na světě [5].

Obrázek č. 2: Incidence a mortalita karcinomu pankreatu v ČR



Legenda: Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) pro zvolenou diagnózu v celé populaci. Analyzovaná data: n (incidence)=44 173; n (mortalita)=39 840. Zdroj: <http://www.svod.cz>

Navzdory závažnosti těchto malignit a velmi špatné prognóze, spojené zejména s karcinomem pankreatu, není jejich etiologie a molekulární patogeneze stále objasněna.

1.1.1. Etiologie a rizikové faktory

V etiologii sporadického karcinomu kolorekta jsou stále častěji zmiňovány stravovací návyky. Maso a jeho nevhodná příprava spolu se sníženým příjmem ovoce a zeleniny bývají uváděny mezi možnými rizikovými faktory. Důvodem tohoto zvýšeného rizika bývají nejčastěji považovány karcinogeny, které vznikají při vysokých teplotách úpravy masa (grilování, smažení), a to polycyklické aromatické uhlovodíky a heterocyklické aminy [6]. Tyto sloučeniny jsou i součástí cigaretového kouře, který je také potenciálním rizikovým faktorem vzniku kolorektálního karcinomu [7].

Publikované rizikové faktory u karcinomu pankreatu jsou věk, pohlaví, diabetes, chronická pankreatitida, dietní návyky, kouření a infekce *Helicobacter pylori* [8, 9, 10].

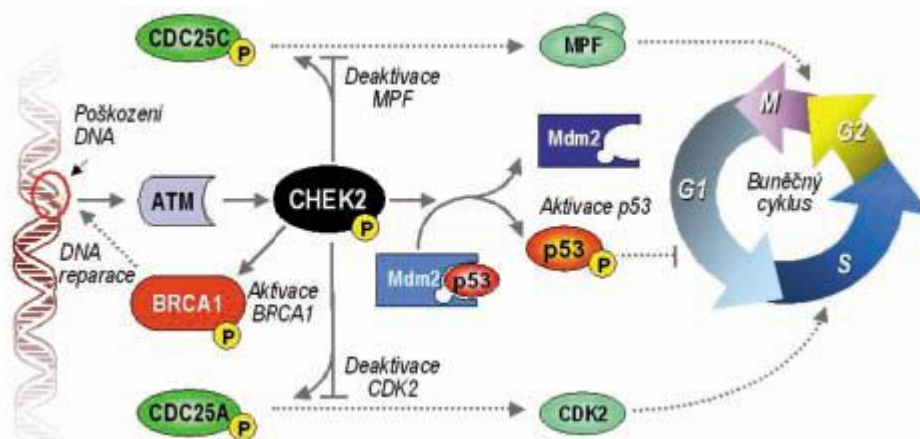
Metabolismus cizorodých látek vyskytujících se v životním prostředí člověka, a to jak aktivace prokarcinogenů, tak odbourávání karcinogenů v organismu, může rovněž hrát důležitou roli při vzniku a rozvoji obou malignit. Polymorfismy v genech kódujících biotransformační enzymy tedy mohou ovlivňovat riziko vzniku nádorového onemocnění u jednotlivce [11, více viz. Kapitola 1.2. Biotransformace a biotransformační enzymy str. 10]

V literatuře se uvádí, že pouze kolem 6% kolorektálních karcinomů a 4-16% karcinomů pankreatu patří k tzv. familiární formě, kdy jsou nalezeny zárodečné mutace v genech s vysokou penetrací [12,13]. Nejznámější hereditární formy karcinomu tlustého střeva a konečníku jsou: familiární polypóza a Lynchův syndrom I a II. Karcinom pankreatu doprovází s nižší četností Lynchův syndrom, Li- Fraumeniho syndrom, hereditární maligní melanom a další. Mutace hereditárních forem nádorových onemocnění se nacházejí v genech podílejících se na regulaci buněčného cyklu, tumor supresorových genech, i proto-onkogenech. Daleko větší podíl na genetické predispozici k nádorovým onemocněním mají pravděpodobně kombinace alterací genů s nízkou penetrací [14,15].

Jedním z intenzivně studovaných genů s nízkou penetrací je *CHEK2* (checkpoint kinase 2) označovaný někdy také jako *CHK2*. Tento gen kóduje proteinkinázu aktivovanou v odpovědi na poškození genomové DNA. Svou aktivitou se podílí na regulaci buněčného cyklu v kontrolních bodech (přechod G1 do S fáze a přechod G2 do M fáze) a indukci apoptózy [16]. Při vzniku dvouřetězcových zlomů genomové DNA je molekula CHEK2 fosforylována pomocí ATM-protein kinázy (produkt tumor supresorového genu *ATM*). Aktivovaný protein CHEK2 následně fosforyluje několik substrátů (Obrázek. č. 3). Fosforylací proteinu p53 na místě serinu v poloze 20 je umožněna vazba mdm2 aktivovaného ATM-dependentní fosforylací, čímž dochází k inhibici degradace p53 a tím k jeho následné stabilizaci v jádře. Zvýšená hladina p53 v buňce vyvolává neadekvátní odpověď na poškození DNA. Protein CHEK2 svým působením inhibuje také funkci fosfatáz *cdc25a* a *cdc25c*.

Tyto fosfatázy jsou odpovědné za průchod přes kontrolní body G1/S a G2/M a tím pokračování buněčného dělení. Jejich inhibicí dochází k zástavě buněčného cyklu v uvedených bodech. Nedávno byla rovněž popsána jistá kooperace *CHEK2* s *BRCA1* na zástavě buněčného cyklu [17].

Obrázek č. 3: Schéma působení proteinu CHEK2 aktivovaného v důsledku genotoxického poškození DNA [18]



V genu *CHEK2* bylo doposud popsáno několik inaktivujících mutací v souvislosti se vznikem jak hereditárních nádorových syndromů (Li-Fraumeni syndrom), tak i sporadických maligních nádorů (karcinom prsu, kolorekta, prostaty, štítné žlázy, osteosarkom). Nejstudovanější mutací je v současné době delece cytosinu v pozici 1100 od iniciačního signálu mRNA *CHEK2* (alela *CHEK2*1100delC*), která způsobuje inaktivaci proteinu CHEK2 díky zkrácení proteinového produktu v místě kinázové domény. Na základě rozsáhlých populačních studií v různých zemích je tato mutace uváděna do souvislosti se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (RR = 2) a výskytem HBCC syndromu - rodinného výskytu karcinomu prsu a kolorekta [19,20]. V nedávné době byla popsána i další mutace I157T zasahující FHA (fork head associated) doménu proteinu, která se rovněž vyskytuje signifikantně častěji u pacientek s karcinodem prsu [21].

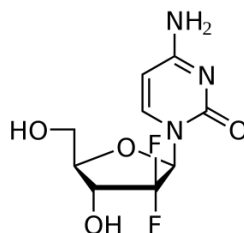
1.1.2. Terapie a prognóza

Prognóza a terapie kolorektálního karcinomu značně závisí na stádiu, ve kterém byla nemoc zjištěna. Zatímco po radikálním odstranění tumoru u počátečních stádií je pětileté přežití vyšší než 80%, u metastatické formy je průměrná doba přežití 11 měsíců. Jediný kurativní postup je radikální resekce tumoru. Chemoterapie je indikována u lokálně pokročilých tumorů po chirurgickém výkonu (adjuvance) a u metastazujících nádorů jako terapie paliativní. Zejména jsou využívány režimy obsahující nukleotidová analoga jako 5-fluorouracil [22].

Prognóza karcinomu pankreatu je vzhledem k mortalitě rovnající se incidenci infaustní. Mezi základní prognostické faktory karcinomu pankreatu patří stádium onemocnění (staging), provedení radikálního chirurgického výkonu a výkonnostní stav pacienta (performance status). Molekulárně biologické prognostické faktory jsou intenzivně studovány, ale zatím bez uplatnění v klinické praxi. Chemoterapií pokročilého karcinomu pankreatu je dosahováno mediánu přežití jen kolem 5-8 měsíců. V kontrolních skupinách bez chemoterapie se pohybuje medián přežití pouze mezi 2-4 měsíci [23]. Jednou z příčin je pozdní diagnostika tohoto typu onemocnění. Klinické příznaky se objevují až v pozdních stádiích a v době diagnózy je již 50 % pacientů s metastatickým postižením. Jediným dnes potenciálně kurativním přístupem je radikální resekce. S ohledem na pozdní diagnózu a špatný výkonnostní stav nemocných podstupuje radikální výkon jen kolem 15 – 20 % pacientů [24]. V adjuvantní i paliativní chemoterapii se uplatňují i zde, stejně jako u kolorektálního karcinomu, zejména nukleotidová analoga. Dnes je uváděn jako lék první volby Gemcitabin.

Gemcitabin (2',2'-difluorodeoxycytidine, Gemzar, Eli-Lilly, Indianapolis, Obrázek č. 4) patří k druhé generaci nukleotidových analogů [25]. Pilotní randomizovaná studie prokázala významně lepší jednoleté přežívání pacientů s karcinomem pankreatu léčených gemcitabinem ve srovnání s těmi, kdo byli léčeni 5-fluorouracilem (18 vs. 2%; $p=0.0001$) [26]. Přestože se gemcitabin stal zlatým standardem v léčbě pokročilého karcinomu pankreatu [27], odpověď na tuto léčbu u pankreatických nádorů zůstává nižší než 10% [28,29]. K tomu významně přispívá získaná rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům, demonstrována inter-individuálními rozdíly ve farmakokinetice a farmakodynamice gemcitabinu.

Obrázek č. 4: Struktura gemcitabinu

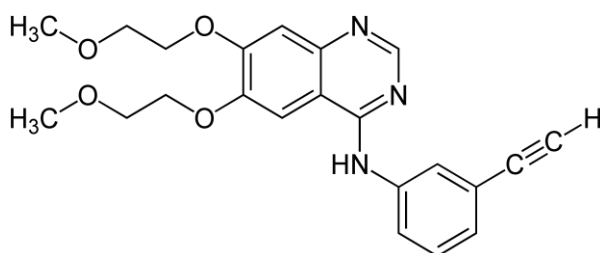


Chemorezistence je způsobena mnoha různými, pravděpodobně na sobě nezávislými, mechanismy jako jsou změny v membránovém transportu pro léčiva, neúčinná metabolická aktivace, zvýšená oprava poškození DNA a alterace apoptotické dráhy [30, 31]. Gemcitabin je transportován do intracelulárního prostoru pomocí nukleosidových transportérů (SLC- Solute carrier transporters). Naopak transportéry rodiny ABC (ATP-binding cassette transporters) způsobují jeho eflux ven z buňky. Intracelulárně dochází k jeho metabolické aktivaci (více viz příloha č.10 a 11).

Erlotinib hydrochlorid (OSI-774, Tarceva, CP-358774, Obrázek č. 5) je per os podávaná molekula, která blokuje intracelulární signální dráhu receptoru epidermalního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor, EGFR, OMIM:131550) pomocí vazby na místo pro ATP, které je nezbytné pro tyrosin kinázovou aktivitu EGFR. Signální dráhy tyrosin kináz jako je EGFR jsou zapojeny do procesů proliferace nádorových buněk, apoptózy, angiogeneze a v procesu metastazování [32, 33]. Erlotinib byl schválen pro léčbu lokálně pokročilého, neoperabilního karcinomu pankreatu, nebo jeho metastatické formy v kombinaci s chemoterapií [34].

Erlotinib je metabolizován cytochromy P450 (CYP), a to zejména CYP3A4 (OMIM:124010) a CYP3A5 (OMIM:605325), méně potom CYP1A1 (OMIM:108330), CYP1A2 (OMIM:124060), CYP1B1 (OMIM: 601771), CYP2D6 (OMIM:124030) a CYP2C8 (OMIM: 601129).

Obrázek č. 5: Struktura erlotinibu



Hlavními cirkulujícími metabolity erlotinibu jsou produkty *O*-demetylace postranního řetězce (např. OSI-420 a OSI-413) [35-37]. Zajímavé z hlediska této práce je, že ABC transportéry se podílí na transportu erlotinibu přes buněčnou membránu a mohou tak ovlivňovat výsledky léčby (více viz. kapitola: Erlotinib a ABC transportéry str. 22).

1.2. Biotransformace a biotransformační enzymy

Biotransformační enzymy, které se nacházejí především v jaterních buňkách, obvykle konvertují xenobiotika rozpustná v tucích na látky rozpustné ve vodě a usnadňují tak jejich vylučování z organismu. Biotransformace se skládá ze tří kroků: 1. fáze (aktivace), 2. fáze (konjugace) a 3. fáze (transport). Hlavními enzymy 1. fáze biotransformace jsou cytochromy P450 a další enzymy jako NAD(P)H:chinon oxidoreduktázy, které katalyzují aktivační reakce, při kterých vznikají reaktivní meziprodukty. Tyto elektrofilní meziprodukty poté snadno konjugují s nukleofilními molekulami jako je např. glutation v reakcích 2. fáze biotransformace. Většina těchto konjugovaných produktů je poté pumpována vně buněk pomocí membránových ABC transportérů. Tyto metabolické pochody ovlivňuje u člověka řada fyziologických faktorů jako pohlaví, věk a stav výživy, ale i faktory patologické, mezi které patří celá řada onemocnění (diabetes mellitus, jaterní cirhóza, onemocnění ledvin a další) [38].

Tabulka č. 1: Hlavní biotransformační enzymy dle [38]

	Protein	EC číslo	Gen	Reakce
Fáze 1				
Cytochrom P450 monooxygenáza	P450	1.14.14.1	<i>CYP</i>	Oxidace, redukce, peroxidace
Flavinové monooxygenázy	FMO	1.14.13.8	<i>FMO</i>	Oxidace
Alkohol dehydrogenázy	ADH	1.1.1.2	<i>ADH</i>	Oxidace alkoholů
Aldehyd dehydrogenázy	ALDH	1.2.1.5	<i>ALDH</i>	Oxidace aldehydů
Monoamin oxidázy	MAO	1.4.3.4	<i>MAO</i>	Oxidativní deaminace
NAD(P)H-chinon oxidoreduktázy	NQO	1.6.5.2	<i>NQO</i>	Redukce chinonů
Epoxidhydrolázy	EPHX	3.3.2.9	<i>EPHX</i>	Hydrolýza epoxidů
NADPH-cytochrom P450 reduktáza	CPR	1.6.2.4	<i>POR</i>	Redukce
Karbonyl reduktázy	CR	1.1.1.184	<i>CBR</i>	Redukce
Aldo-keto reduktázy	ALR	1.1.1.21	<i>AKR</i>	Redukce
Karboxyl esterázy	CE	3.1.1.2	<i>PON</i>	Hydrolýza
Deaminázy	CD	3.5.4.1	<i>CDA</i>	Hydrolytická deaminace
Fáze 2				
Glutacion S-transferázy	GST	2.5.1.18	<i>GST</i>	Konjugace s glutationem
UDP-Glukuronosyltransferázy	UGT	2.4.1.17	<i>UGT</i>	Konjugace s glukuronidem
N-acetyltransferázy	NAT	2.3.1.5	<i>NAT</i>	Acetylace
Sulfonyltransferázy	SULT	2.8.2.3	<i>SULT</i>	Konjugace se sulfátem
Fáze 3				
ABC transportéry	MDR	3.6.3.44	<i>ABCB</i>	Transmembránový transport
	MRP	3.6.3.44	<i>ABCC</i>	Transmembránový transport
	BCRP	3.6.3.44	<i>ABCG</i>	Transmembránový transport
Protein spojený s rezistencí plic	LRP	3.6.3.44	<i>MVP</i>	Jádro-cytoplazma transport

Legenda: Číslo EC (z anglického Enzyme Commission number) je numerické klasifikační schéma pro enzymy založené na chemických reakcích, které katalyzují. Každé EC číslo je doplněno doporučeným názvem reprezentovaného enzymu.

1.2.1. Polymorfismy v biotransformačních enzimech 1. fáze biotransformace a vztah k nádorovým onemocněním

Karcinogeny tabákového kouře jako je např. nitrosamin 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) jsou v lidském těle metabolizovány za účasti CYP. NNK dokáže indukovat nádorové onemocnění plic, nosní dutiny, pankreatu a jater u laboratorních potkanů [39, 40]. Mezi biotransformační enzymy, účastníci se na produkci jak keto-aldehydu, tak i keto-alkoholu z NNK, se řadí CYP2A13. *CYP2A13* (cytochrom P450 2A13, OMIM: 608055) se nachází, stejně jako ostatní členové CYP2A podrodiny, na dlouhém raménku chromosomu 19 [41]. Některé polymorfismy *CYP2A13* vedou ke změnám enzymatické funkce proteinu, např. záměnou cystidinu za arginin v kodonu 257 vzniká enzym s dvakrát nižší katalytickou účinností. Tento polymorfismus je uváděn v souvislosti s rizikem bronchogenního karcinomu v čínské populaci [42], avšak v bělošské populaci se vyskytuje ve frekvenci nižší než 1% [43]. Naopak nonsense polymorfismus Arg101STOP (dbSNP: rs72552266) [44], který enzymovou aktivitu zcela poškozuje, byl nalezen ve frekvenci 3,8% [43] ve francouzské bělošské populaci a jeho relevance je tedy nesporná.

Epoxidhydroláza 1 (EPHX1, EC 3.3.2.3) je enzym, který navazuje na metabolické reakce CYP. Substrátem jsou aromatické či alifatické epoxidy, které jsou hydrolyzovány na, méně toxické a ve vodě rozpustné, *trans*-dihydrodioly vylučované z organismu po konjugaci s glutationem, popř. glukuronátem. Epoxidhydroláza se účastní také aktivace některých prokarcinogenů, např. z benzo[*a*]pyrenu vzniká 7,8-diol-9,10-epoxid, který je vysoce mutagenní. Dvě běžně se vyskytující alely *EPHX1* v kodónech 113 (Tyr113His; rs1051740) a 139 (His139Arg; rs2234922) mají vliv na enzymovou aktivitu [45]. Nicméně souvislost těchto polymorfismů s rizikem vzniku nádoru tlustého střeva a pankreatu nebyla zatím nalezena [46, 47].

Metabolismus etanolu je v pankreatických buňkách acínů zprostředkován jak oxidativní, tak i nonoxidativní cestou [48, 49, 50]. Hlavními enzymy zodpovědnými za oxidativní transformaci alkoholu jsou alkohol dehydrogenázy (ADH, EC 1.1.1.2) a aldehyd dehydrogenázy (ALDH, EC 1.2.1.5) [51]. Genotypováním 9080 dobrovolníků Tolstrup et al. 2008 [52] prokázal, že pomalí metabolizátoři s genotypem *ADH1B*1/*1* pijí více alkoholu a mají vyšší riziko alkoholismu než rychlí metabolizátoři (*ADH1B*2/*2*), stejně jako v případě haplotypu *ADH1B*1-ADH1C*2* [53]. Předchozí studie popisují vztah mezi *ADH1B*1* alelou a zvýšeným rizikem nádorového onemocnění jícnu [54, 55] a dlaždicobuněčným karcinomem v oblasti hlavy a krku [56]. Také v případě *ADH1C*2/*2* genotypu byla nalezena souvislost se zvýšeným rizikem nádoru dutiny ústní dle studie prováděné Solomonem et al. 2008 [57].

1.2.2. Polymorfismy v biotransformačních enzimech 2. fáze biotransformace a vztah k nádorovým onemocněním

Glutation *S*-transferázy (GSTs; EC 2.5.1.18) jako *GSTM1* (OMIM: 138350), *GSTP1* (OMIM: 134660) a *GSTT1* (OMIM: 600436) zajišťují detoxikační reakce 2. fáze biotransformace, a jsou zároveň schopny aktivovat prokarcinogeny (např. methyl chlorid, alkylační činidla, polycyklické aromáty). Katalyzují konjugaci s glutationem.

Genetické varianty GST jsou častým předmětem studia ve vztahu k nádorovým onemocněním, neboť jejich detoxikační funkce je nepostradatelná u celé řady potenciálních karcinogenů. Rozsáhlá genomická delece v genech kódujících *GSTM1* a *GSTT1* (null genotyp) má za následek kompletní ztrátu enzymatické aktivity. Polymorfismus Ile105Val (rs1695) v genu *GSTP1* generuje enzymy s rozdílnou tepelnou stabilitou a substrátovou afinitou [58]. Polymorfní varianty *GSTP1* mohou mít protektivní vliv v případě nádorů pankreatu u starších osob a jejich nositelé mají významně lepší přežívání ve skupině pacientů léčených 5-fluorouracilem [59]. Ferraz et al. [60] navíc předpokládá, že se *GSTT1* a *GSTP1* podílí na výskytu mutací v dalších důležitých genech karcinogeneze, jako jsou geny *KRAS* a *TP53* u kolorektálního karcinomu. Nedávno byl rovněž publikován vztah mezi polymorfismy v genech *EPHX1*, *GSTM1* a *GSTT1* a vyšší mírou poškození DNA (konkrétně jednořetězcových zlomů DNA) v České populaci [61].

1.2.3. Polymorfismy v enzimech účastnících se metabolismu volných radikálů, oxidační stres a vztah k nádorovým onemocněním

V průběhu metabolismu, jak endogenních, tak i exogenních substrátů (např. tabákový kouř, etanol), vznikají v buňkách těla produkty se silnými biologickými účinky, tzv. volné radikály [62,63]. V současnosti se předpokládá, že reaktivní formy kyslíku (oxidativní stres) hrají roli v řadě patologických stavů, včetně zánětu (chronické pankreatitidy) [64] a dysfunkce β -buněk pankreatických acinů (diabetu) [65]. Díky významu působení oxidativního stresu u většiny výše jmenovaných rizikových faktorů karcinomu pankreatu, může genetická variabilita v genech kódujících enzymy metabolismu volných radikálů hrát důležitou roli při vzniku a rozvoji této malignity.

Superoxid anionradikál ($O_2^{\bullet-}$) vzniká účinkem enzymů jako jsou cytochrom P450 reduktáza a xanthinoxidáza [66]. Jsou-li při zánětu stimulované neutrofilny, dojde u nich k respiračnímu vzplanutí, při kterém je superoxid anionradikál produkován v reakci katalyzované NADPH-oxidázou. Superoxid dismutáza 2 (SOD2, OMIM:147460) podstatně urychluje přeměnu superoxidového anionradikálu na peroxid vodíku a kyslík v mitochondriích, zatímco superoxid dismutáza 3 (SOD3, OMIM: 185490) takto funguje extracelulárně. Polymorfismus *SOD2* (Ala16Val, rs4880) v signální sekvenci genu vede ke změnám v konformaci helikální struktury proteinu. Valinová varianta enzymu má nižší schopnost transportu do mitochondrií [67]. Dřívější studie našly významně vyšší riziko vzniku jak nádorů plic [68], tak i močového měchýře [69] a prsu [70] u osob s touto alelou. V kontrastu s těmito výsledky bylo naopak zjištěno vyšší riziko nádorů prostaty [71] u osob s divokým typem *SOD2*. U karcinomu pankreatu bylo zjištěno vyšší riziko pro nositele Val/Val genotypu (OR=1,96; CI= 1,0-3,8) [72], ovšem jen s hraniční statistickou významností.

Ve vztahu k nádorovým onemocněním bylo studováno i několik polymorfismů v genu *SOD3* (Ex3-631C>G, rs1799895; IVS1-186C>T, rs699473; Ex3-516 C>T, rs2853796; a Ex3-489 C>T, rs2855262), ale žádný významnější vliv na riziko vzniku maligního nádoru nebyl potvrzen [71].

NAD(P)H:chinon oxidoreduktázy (NQO1; OMIM: 125860 a NQO2; OMIM: 160998) katalyzují dvouelektronovou redukci chinonů na hydrochinony. NQO o chinony soupeří s NADPH-cytochrom P450 reduktázou, která jedoelektronovým mechanismem redukuje chinon na hydrochinon za vzniku velmi reaktivního meziprojektu semichinonu a vedlejšího produktu, kterým je právě výše zmíněný superoxid anionradikál. Chinony a jejich redukované formy hydrochinony jsou mutageny, které vytváří addukty DNA. Polymorfismy v exonu 6 NQO1 (Pro187Ser, rs1800566) a v exonu 3 NQO2 (Phe47Leu, rs1143684) jsou spojeny s nižší katalytickou aktivitou enzymů [73, 74]. Expresse NQO1 byla navržena i jako možný kandidátní biomarker pro karcinom pankreatu, a to zejména u kuřáků [75].

Tabulka č. 2: Přehled studovaných polymorfismů u enzymů 1. a 2. fáze biotransformace v rámci této dizertační práce

Gen	OMIM	dbSNP rs	Lokalizace	Změna struktury enzymu	Ovlivnění funkce enzymu
<i>CYP2A13</i>	608055	72552266	19q13.2	Arg101stop	ztráta funkce
<i>EPHX1</i>	132810	1051740	1q42.1	Tyr113His	snížení aktivity o 60%
<i>EPHX1</i>	132810	2292566	1q42.1	His139Arg	zvýšení aktivity o 25%
<i>GSTM1</i>	138350		1p13.3	delece	ztráta funkce
<i>GSTP1</i>	134660	1695	11q13	Ile105Val	snížení aktivity
<i>GSTT1</i>	600436		22q11.2	delece	ztráta funkce
<i>ADH1B</i>	103720	1229984	4q22	Arg48His	snížení aktivity
<i>ADH1C</i>	103730	698	4q22	Ile350Val	zvýšení aktivity
<i>SOD2</i>	147460	4880	6q25.3	Ala16Val	snížení aktivity
<i>SOD3</i>	185490	1799895	4p15	Arg231Gly	neznámo
<i>NQO1</i>	125860	1800566	16q22.1	Pro187Ser	ztráta funkce
<i>NQO2</i>	160998	1143684	6p.25	Phe47Leu	snížení aktivity

Všechny tyto enzymy se tak velkou mírou podílejí na ochraně buněk před poškozením volnými radikály a z tohoto důvodu jsme v další studii sledovali vliv jejich polymorfismů na rozvoj nádorových onemocnění. Studium vztahů mezi polymorfismy v genech metabolismu NNK a alkoholu a rizikem vzniku karcinomu pankreatu by mohlo přinést zásadní informace pro identifikaci rizikových skupin, na něž by bylo vhodné zaměřit primární (úpravy životního stylu či chemoprevence) i sekundární (skrínink pro nalezení onemocnění v časných stádiích) prevenci.

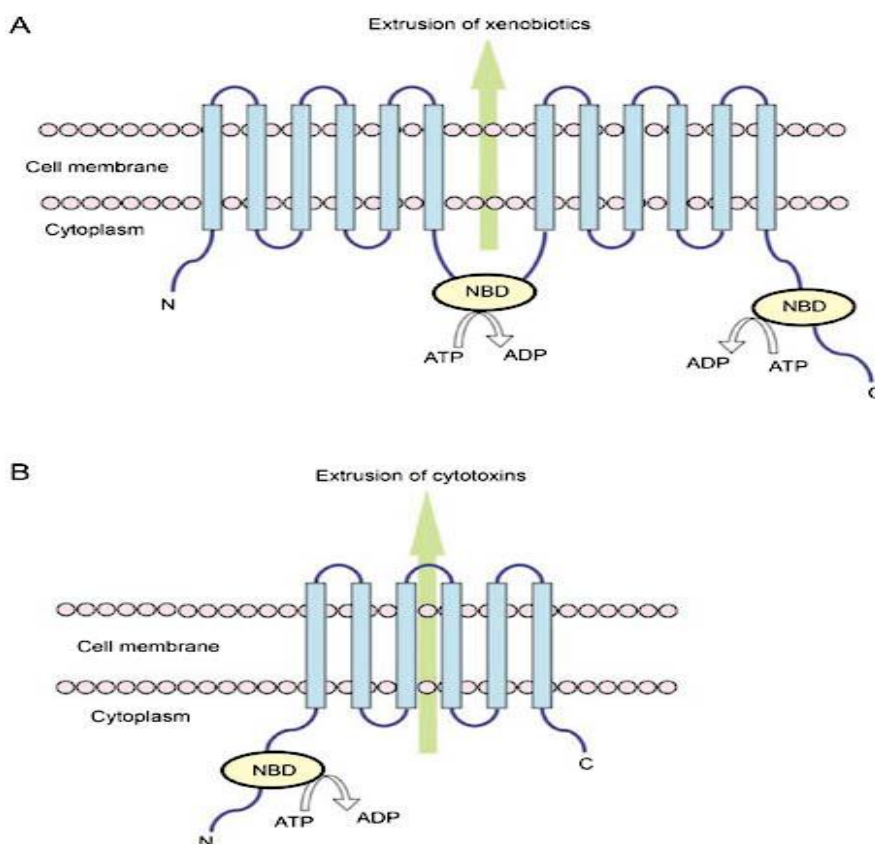
1.2.4. Membránové transportéry- enzymy 3. fáze biotransformace a vztah k nádorovým onemocněním

1.2.4.1. ATP-Binding Cassette (ABC) transportéry

Jedním z nejdůležitějších mechanismů chemorezistence je snížená akumulace léčiva v nádorových buňkách díky jeho zvýšenému úniku (efflux). Ten je zprostředkován zejména proteiny, které z velké části přísluší k nadrovině ABC transportérů (human ATP-binding cassette transporters).

K dnešnímu datu bylo v lidském genomu identifikováno 49 různých ABC transportérů. Dělí se do 7 tříd (A-G) na základě sekvenční podobnosti [76]. U čtrnácti ABC transportérů (popsaných níže) byla prokázána schopnost navodit chemorezistenci v nádorových buňkách. Ty lze rozdělit do dvou skupin, a to na skupinu proteinů zodpovědných za tzv. fenotyp mnohočetné nádorové rezistence (multi drug resistance, MDR) jak v buněčných liniích, tak i u pacientů s rozličnými typy maligních nádorů (např. *ABCB1/MDR1*, OMIM: 171050, *ABCC1/MRP1*, OMIM: 158343 a *ABCG2/BCRP*, OMIM: 603756), a druhou skupinu, kam lze zařadit transportéry, u kterých byla tato schopnost zatím prokázána jen v některých experimentech (např. *ABCA2*, OMIM: 600047, *ABCB4*, OMIM: 171060, *ABCB11*, OMIM: 603201, *ABCC2*, OMIM: 601107, *ABCC3*, OMIM: 604323, *ABCC4*, OMIM: 605250, *ABCC5*, OMIM: 605251, *ABCC6*, OMIM: 603234, *ABCC10*, OMIM: 612509, *ABCC11*, OMIM: 607040 a *ABCC12*, OMIM: 607041)[77].

Obrázek č. 6: Struktura halvních zástupců ABC transportérů



Legenda: Ačkoliv je ve stavbě ABC transportérů velká rozmanitost, dají se vystopovat některé obecné rysy. ABC pumpy se skládají z 2–4 domén: některé se označují NBD (nucleotide binding domain) a jsou schopné navázat ATP, jiné jsou označovány TMD (transmembrane domain) a ty představují v typickém případě šest alfa-helixů (zobrazených jako modré obdélníky) procházejících přes membránu. (A) - ABCB1 je typický transportér této rodiny skládající se ze 4 domén - dvou NBD a dvou TMD. (B) - ABCG2, který je poloviční transportér složený pouze ze dvou domén. Zdroj: Tingting et al. Cell Research (2006).

ABCA2 je exprimován zejména v buňkách nervového a hematopoetického systému a je spojen s transportem lipidů a chemorezistencí v nádorových buňkách. Nedávno byl zjištěn jednonukleotidový polymorfismus (SNP z angl. single nucleotide polymorphism) v tomto genu, který je zodpovědný za časný nástup Alzheimerovy choroby [78]. Zatím nebyly publikovány práce týkající se míry exprese a genetické variability *ABCA2* genu v pankreatické tkáni.

ABCB1, také nazýván MDR1, či P-glykoprotein je nejdéle známý a v současnosti nejlépe prostudovaný zástupce ABC transportérů. Substrátem ABCB1 jsou obecně hydrofóbní léky s polyaromatickým jádrem a neutrálním, nebo kladným nábojem, např. etoposid, adriamycin, vinblastin [79]. Dříve provedené studie prokázaly, že genetické polymorfismy v *ABCB1* genu jsou důležitou

determinantou jeho fenotypu, tedy exprese, funkce a obecně ovlivňují odpověď na farmakoterapii [80, 81, 82]. Dle závěrů japonských studií [81, 83] vykazují haplotypy *ABCB1* významnější vztah k míře exprese než jednotlivé polymorfismy. Proto lze předpokládat, že haplotypy mohou lépe určit vztah mezi genotypem a fenotypem tohoto transportéru a velmi pravděpodobně bude tento princip univerzální. *ABCB1* mRNA a P-glykoprotein byly detekovány pomocí reverzní transkripce spojené s polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) a pomocí imunohistochemie (IHC) ve 2 pankreatických nádorových buněčných liniích SW1990 a CAPAN-1 [84]. Jensen et al. 1997 našli zvýšenou citlivost vůči gemcitabinu v nádorových buňkách malobuněčného karcinomu plic (SCLC) s vysokou expresí genu *ABCB1* [85]. Podobně senzitivní jsou i buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic (2R160), ovaria (2780ADd) a epidermoidu (KB8-5e), kde je *ABCB1* rovněž zvýšeně exprimován [86]. Vysoce pozitivní imunohistochemické barvení pro P-glykoprotein bylo nalezeno u 73% duktálních adenokarcinomů pankreatu (n = 103), přičemž exprese *ABCB1* genu byla detekována ve všech vyšetřených tumorech, a to ve zvýšené míře oproti normální tkáni slinivky břišní. Vyšší míra exprese *ABCB1* dle autorů významně korelovala s lepší prognózou a byla uvedena do souvislosti s menší biologickou agresivitou nádoru [87]. Na tuto studii navázala skupina autorů [88], v jejichž studii bylo 75% vzorků karcinomu pankreatu imunohistochemicky pozitivní na přítomnost proteinu *ABCB1* (n = 63). Pacienti s nízkou či střední expresí proteinu vykazovali delší dobu přežití než pacienti bez exprese. Velmi zajímavé bylo, že u případů s vysokým stupněm exprese genu *ABCB1* bylo nalezeno kratší přežívání než u těch s nižší expresí. Autoři usuzují, že se na tomto kontroverzním faktu mohou podílet další geny spojeny s lékovou rezistencí, jako např. *ABCB2*.

Expresa *ABCB1* se tedy jeví jako obecný fenomén vyskytující se v nenádorové i nádorové tkáni, jehož klinický dopad není stále jasný, a zdá se tedy aktuální pro podrobné studium u jednotlivých typů nádorů. V naší laboratoři již delší dobu probíhá studium *ABCB1* v nádorové tkáni prsu. Mezi první publikované výsledky patří prokázáný vztah mezi jednotlivými polymorfismy genu *ABCB1* a mírou exprese tohoto genu (resp. hladinou transkriptu v nádorech prsu). Výskyt funkčních polymorfismů navíc koreloval s prognózou onemocnění (stav estrogenních receptorů) [82].

ABCC rodina zahrnuje 13 členů, přičemž 9 z nich se řadí mezi tzv. multidrug resistance proteins (MRP1-MRP9 resp. ABCC1-ABCC6 a ABCC10-ABCC12). ABCC7 (CFTR, OMIM: 602421) je chloridový kanál spojený s onemocněním cystickou fibrózou. ABCC8 a ABCC9 (OMIM: 600509 a 601439) jsou receptory pro sulfonylureu a *ABCC13* je pseudogen bez schopnosti transmembránového transport [89]. *In vitro*, ABCC transportéry mohou navodit rezistenci vůči nádorovým léčivům a jejich konjugovaným metabolitům, jako jsou platinové deriváty, folátové antimetabolity, nukleosidová a nukleotidová analoga, arsenové a antimoniové oxyanionty, a (ve spojení s alterací 2. fáze biotransformace) také vůči alkylačním činidlům [shrnutí v 90].

Buňky plicního karcinomu 2R120 (exprimující vysoké hladiny *ABCC1*) a 2R160 (exprimující vysoké hladiny *ABCB1*) byly 9krát a 28krát citlivější vůči gemcitabinu než jejich mateřské buněčné linie SW1573 ($p < 0,01$). Vzhledem k faktu, že v těchto buňkách byla nalezena mnohokrát vyšší aktivita DCK (deoxycytidin kinázy), předpokládá se, že zvýšená exprese genů *ABCB1* a *ABCC1* může způsobovat buněčný stres, ústící ve zvýšený metabolismus gemcitabinu a tedy i vyšší citlivosti vůči němu [86].

ABCC4 a *ABCC5* transportují nukleosidové monofosfáty [91, 92]. Davidson et al. [93] našli významnou chemorezistenci vůči cytaribinu, gemcitabinu a kladribinu u buněk HEK293 zvýšeně exprimujících *ABCC5*. Nicméně Reid et al. [94] u stejné buněčné linie žádnou rezistenci vůči nukleotidovým analogům nedetekovali. K vyjasnění tohoto rozporu prověřili Oguri et al. [95] expresi *ABCC5* v buněčných liniích nemalobuněčného plicního karcinomu. Ve všech liniích exprese genu *ABCC5* inverzně korelovala s mírou citlivosti vůči gemcitabinu. Po inhibici tohoto transportéru pomocí zaprinastu nebo siRNA byla citlivost buněk vůči gemcitabinu snížena. Zdá se tedy, že *ABCC5* zůstává zajímavým cílem dalších studií zabývajících se chemorezistencí u nádorů pankreatu.

Expese genu *ABCC10* byla zjištěna v různých tkáních a nádorech včetně vysoké exprese v tkáni karcinomu pankreatu. Jeho regulace zřejmě závisí na genu *TP53*, protože v buňkách s alterovaným *TP53* byla potlačena jeho upregulace, kterou lze navodit pomocí doxorubicinu. Tento transportér však není zapojen do přenosu nukleotidů [96]. *ABCC11* je aniontový transporter, který je schopný pumpovat nukleotidy vně buněk a fungovat tedy i jako faktor chemorezistence pro běžně užívaná pyrimidinová analoga [97].

König et al. [98] kvantifikovali mRNA expresi devíti členů *ABCC* podrodiny a genu *ABCG2* v normální tkáni slinivky břišní a v tkáni karcinomu pankreatu ($n=37$). Ve zdravé tkáni pankreatu i v ductálním adenokarcinomu byly exprimovány geny *ABCC1-6* a *ABCC10*, zatímco gen *ABCC12* (kódující protein MRP9) byl detekován jen v normálním parenchymu slinivky břišní. Expese *ABCC3* a *ABCC5* proteinů byla v nádorových vzorcích zvýšená a navíc expese *ABCC5* korelovala s gradingem nádoru. Přestože byla objevena řada polymorfismů v genech *ABCC* podrodiny, jejich spojení s klinickým fenotypem povětšinou zůstává neobjasněno [99]. Lidské buněčné linie HEK293 transfekované *ABCG2* jsou rezistentní vůči gemcitabinu [100]. V pěti buněčných liniích karcinomu pankreatu byla, pomocí real-time PCR, nalezena významně zvýšená hladina *ABCG2* mRNA ve srovnání s nenádorovými fibroblasty [101]. cDNA fragmenty *ABCG2* byly amplifikovány jak v nádorové tkáni, tak i v okolní pankreatické tkáni, ale nebyly mezi nimi nalezeny žádné rozdíly [98].

Dosud známé údaje o expresi a účincích *ABCB1*, *ABCG2* a *ABCC* rodiny u nádorů pankreatu jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Exprese a funkce vybraných ABC transportérů ve vztahu k nádorům pankreatu

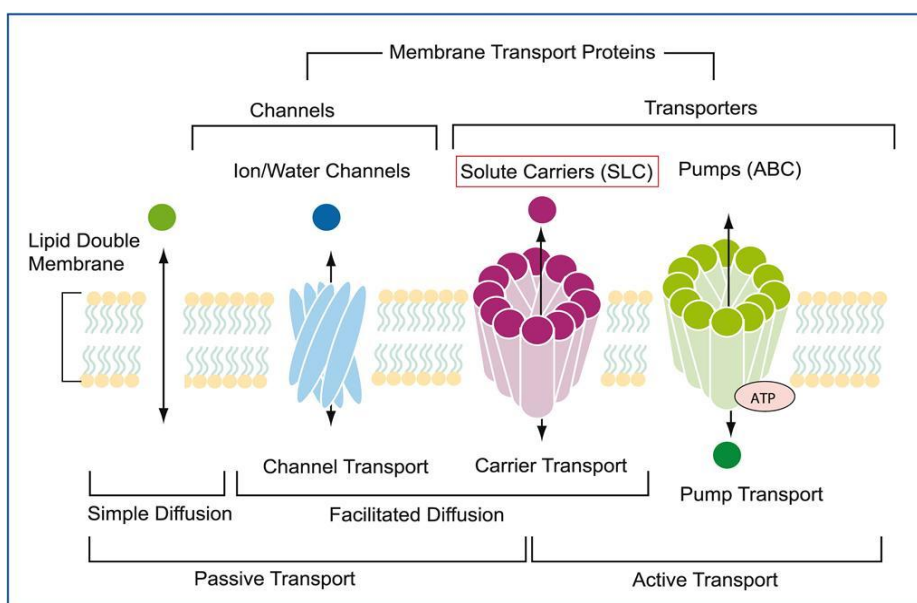
Gen	Protein	OMIM	Lokus	Rezistence*	Exprese v pankreatu	Exprese v tumoru	Reference
<i>ABCB1</i>	MDR1	171050	7q21	zvýšení citlivosti	ano	vyšší	76,84-87
<i>ABCC1</i>	MRP1	158343	16p13	zvýšení citlivosti	ano	stejná	76, 86, 98
<i>ABCC2</i>	MRP2	601107	10q24	neprokázána	ano	stejná	76, 98
<i>ABCC3</i>	MRP3	604323	17q22	neprokázána	ano	vyšší	76, 98
<i>ABCC4</i>	MRP4	605250	13q32	neprokázána	ano	stejná	76, 94, 98
<i>ABCC5</i>	MRP5	605251	3q27	zvýšení rezistence	ano	vyšší	93, 95, 76, 98
<i>ABCC6</i>	MRP6	603234	16p13	neprokázána	ano	neověřena	76, 98
<i>ABCC10</i>	MRP7	612509	6p12	neprokázána	ano	neověřena	76, 98
<i>ABCC11</i>	MRP8	607040	16q12	zvýšení rezistence	ano	neověřena	76, 97, 98
<i>ABCC12</i>	MRP9	607041	16q12	neprokázána	ano	neověřena	76, 98
<i>ABCG2</i>	BCRP	603756	4q22	zvýšení rezistence	ano	neověřena	76, 98, 100

Legenda: *Rezistence vůči nukleotidovým analogům při zvýšené expresi genu.

1.2.4.2. Nukleosidové transportéry

Přestože gemcitabin je hydrofilní látka, pravděpodobně nedochází k jeho významnému průniku přes plazmatickou membránu prostou difúzí. Nukleosidový transport se vyskytuje jako Na^+ - independentní, obousměrný, prováděný hENT (human Equilibrative Nucleoside Transporter, také označovány jako rodina SLC29), nebo jako Na^+ - dependentní, prováděný hCNT (human Concentrative Nucleoside Transporter, rodina SLC28). Zatím je známo 7 nukleosidových transportérů, které se dělí do dvou rodin proteinů: SLC29 (SLC29A2, SLC29A3, SLC29A4, známé rovněž jako hENT1, hENT2, hENT3 a hENT4) a SLC28 (SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3, také označovány jako hCNT1 a hCNT2 a hCNT3) [102, 103].

Obrázek č. 7: Možnosti transmembránového transportu látek



Legenda: zdroj: <http://www.biosite.se>

Současný výzkum prokázal, že buňky, které nejsou schopny transportu pomocí těchto proteinů, jsou k inhibici gemcitabinem významně rezistentní. Příkladem je např. inhibice nukleosidových transportérů inhibitory typu dipyridamolu, která způsobí nárůst rezistence vůči gemcitabinu u buněk takto inkubovaných buněčných liniích [104].

Gemcitabin je podáván jako i.v. bolus v infuzi trvající cca 30 minut, a to první, osmý a patnáctý den 28-denního cyklu, nebo jednou týdně po dobu 2 měsíců. Maximální koncentrace v séru dosahuje hodnoty $50\mu\text{M}$ a deaminace způsobuje rychlý pokles plazmatické koncentrace, která v průběhu 2 hodin klesne pod hranici stanovitelnosti. Z uvedeného vyplývá, že buňky jsou vystaveny významné koncentraci gemcitabinu pouze krátkou dobu a neúčinný buněčný uptake je velmi

pravděpodobně jedním z mechanismů chemorezistence [104].

Gemcitabinový uptake je zajišťován transportéry: $SLC29A1 \approx SLC28A1 > SLC29A2 > SLC28A3 \ggg SLC28A2$. [104]. Ve tkáních pankreatu je exprimován *SLC29A1*, *SLC29A2* [103], ale vyskytují se zde i hCNT transportéry (*SLC28A1*, *SLC28A2*, *SLC28A3*), jejichž exprese v nádorových tkáních je velmi variabilní [105].

Studie *in vitro* ukázaly, že gemcitabin je do buněk transportován převážně díky *SLC29A1* transportéru [105] a použití inhibitorů, jako je nitrobenzyl-merkaptopurin-ribosid či dipyridamol, snížilo více než 20-ti násobně citlivost vůči gemcitabinu [104]. Imunohistochemická studie na nádorových tkáních od 21 pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu ukázala, že pacienti s vysokou expresí *SLC29A1* měli významně delší medián přežití, než ti s nízkou expresí či absencí *SLC29A1* (13 versus 4 měsíce, $p=0,01$) [106]. Podobné výsledky ukazuje i farmakogenetická studie na 83 pacientech, kdy byla exprese analyzována pomocí PCR a dle autorů bylo celkové přežívání delší u pacientů s vysokou hladinou transkriptů *SLC29A1* (25,7 versus 8,5 měsíců) [107].

Proto exprese *SLC29A1*, a pravděpodobně i dalších zástupců nukleosidových transportérů jako *SLC28A3*, může být slibným prediktivním markerem výsledku léčby gemcitabinem u pacientů s nádory slinivky břišní.

1.2.4.3. Erlotinib a ABC Transportéry

Erlotinib je substrátem *in vitro* pro ABC transportéry jako ABCB1 a ABCG2, ale ne pro ABCC2 [108]. *In vivo*, je u myši s absencí těchto dvou transportérů (ABCB1 a ABCG2) výrazně ovlivněna biologická dostupnost erlotinibu při per os aplikaci. Rovněž bylo prokázáno, že při vyšších koncentracích dokáže erlotinib inhibovat efflux jiných látek zprostředkovaný transportéry ABCB1, ABCG2 a ABCC10 [109, 110].

ABCG2 SNP (421C>A, Q141K, rs2231142) byl spojen s vyšší akumulací erlotinibu a může tedy potenciálně hrát významnou roli v toxicitě a účinnosti terapie. U funkčního polymorfismu ABCB1 SNP (3435C>T, rs1045642) naopak žádný vztah k farmakokinetice erlotinibu zjištěn nebyl [111]. Nedávno publikovaná studie ukázala na dvě polymorfnní místa ABCG2 promotoru (-15622C>T, a 1143C>T, rs2622604), která farmakokinetické parametry erlotinibu v biologickém systému výrazně ovlivňují, a to včetně maximální plazmatické koncentrace. Navíc se, u těchto SNP v ABCG2, potvrdil i předpokládaný vliv na toxicitu léčby [112].

Zatím nebyly publikovány žádné práce o SLC transportérech a jejich vztahu k erlotinibu. Vzhledem ke struktuře erlotinibu se význam SLC pro jeho transport nepředpokládá.

Je tedy téměř jisté, že transmembránové proteiny rodiny ABC jsou klíčové pro úspěšnost a výsledky nejen chemoterapie, ale i nových preparátů užívaných v biologické léčbě nádorů. Další studie individuálních rozdílů v genotypu a fenotypu těchto transportérů jsou zapotřebí k definování léčebných modalit, jako např. dávkování a nejvhodnější kombinace chemoterapeutik pro každého pacienta (individualizovaná terapie), a tak k dosažení lepších výsledků v protinádorové léčbě.

1.3. Specifika studia genových expresí u karcinomu pankreatu

Genové expresní profilování poskytuje důležité informace o molekulárních a biologických charakteristikách nádorů a je hojně využíváno při objevování nádorových biomarkerů [113], stejně jako při identifikaci skupin genů zodpovědných za specifické funkční aspekty v chování nádorů, jako např. rozdílů v transportu a metabolismu cytostatik v nádorových buňkách. V případě karcinomu pankreatu je sledování míry exprese jednotlivých genů spojeno s výraznějšími problémy ve srovnání s jinými typy karcinomů.

Pro studium regulace genové exprese byla vyvinuta řada metod. Strategie relativní kvantifikace je adekvátní a uznávaná metoda pro výzkum fyziologických změn v genové expresi [114]. Existuje několik základních požadavků pro analýzu za pomoci qPCR metody - metody kvantitativního srovnání polymerázové řetězové reakce v reálném čase (quantitative Real-Time PCR).

Prvním a klíčovým krokem je správný odběr, manipulace a zpracování vzorku biologického materiálu [115], v případě nádorů tedy postižené tkáně od pacienta. Přes vysokou mortalitu je prevalence karcinomů pankreatu v České Republice 19,2/100 000 obyvatel [3]. Navíc má v době diagnózy jen 15-20% pacientů operabilní stádium nemoci. Kromě velkých zahraničních center, musí být tedy obvykle do studie zapojeno více chirurgických pracovišť, aby bylo možno získat dostatečné množství vzorků ke studiu.

Dalším problémem u karcinomu pankreatu je jeho histologická charakteristika. Je pro něj typické nízké zastoupení nádorových buněk v poměru k výraznému okolnímu vazivovému stromatu. Toto nízké zastoupení infiltrujících neoplastických epiteliálních buněk v hojně desmoplastické přestavbě je poměrně unikátní a není pro karcinomy jiných orgánů obvyklé. K překonání tohoto problému existují dva přístupy. Prvním je mikrodisekce, nebo purifikace epiteliálních komponent nádoru a druhým, poměrně technicky lépe proveditelným, je koanalýza resekovaných vzorků nádorů společně se vzorky chronické pankreatitidy, nebo buněčnými liniemi [116].

Pro úspěšnou analýzu je zásadní získání RNA dostatečné kvality a kvantity [114]. Fleige et al. Prokázali významný vliv RNA integrity na výsledky expresních studií, zejména vliv na počty cyklů potřebných k amplifikaci stanoveného množství PCR amplikonů (Ct), méně pak na úspěšnost PCR reakce. Tkáň slinivky břišní však obsahuje obrovské množství endogenních ribonukleáz (degradačních enzymů štěpících RNA na fragmenty), které jsou produkty normálních acinárních buněk pankreatu a tedy i nedílnou součástí pankreatické šťávy, kterou slinivka secernuje do duodena. RNAázy způsobují rozsáhlou degradaci RNA v pankreatické tkáni a velmi komplikují izolaci a další zpracování RNA.

Posledním důležitým krokem pro qPCR analýzu je výběr vhodných interních standardů,

protože míra exprese studovaného genu je stanovována relativně vzhledem k míře exprese referenčního genu.

Interní standard (referenční gen) je v ideálním případě exprimován ve všech sledovaných typech buněk, nezávisle na experimentálních podmínkách, a neměl by být ovlivněn chorobnými změnami. V případě karcinomu pankreatu by se jeho exprese tedy neměla lišit mezi tkání slinivky a tkání nádoru u stejného pacienta, stejně jako by se neměla lišit ani mezi jednotlivými pacienty. Ještě nedávno se předpokládalo, že tyto podmínky nejlépe splňují tzv. housekeeping geny- geny nezbytné pro základní životní funkce buňky, jako glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (*GAPDH*), 18S ribosomální RNA podjednotka, β -aktin nebo cyklofilin, které byly jako referenční geny nejvíce používány. Nicméně bylo zjištěno, že tyto populární referenční geny vykazují jasné rozdíly v genové expresi v některých typech tkání a značně se liší mezi zdravou tkání a tkání maligně transformovanou [117, 118, 119].

Rubie et al. [120] otestoval 21 známých a běžně užívaných referenčních genů pomocí qPCR u pěti malignit gastrointestinálního traktu, mezi kterými byl i karcinom pankreatu. 18S-RNA, glutaminyl-tRNA syntetáza (*QARS*), fosfomannomutáza (*PMM1*), RNA polymeráza II polypeptid L (*POLR2L*) a β -glukuronidáza (*GUSB*) vykazovaly nejlepší stabilitu.

Z výše uvedených důvodů se ještě před deseti lety předpokládalo, že nelze stanovit expresní profily u tkání pankreatu stejně jako u jeho nádorů kvůli abnormálně vysoké přítomnosti ribonukleáz a dalších enzymů a nízkého zastoupení nádorových buněk v povětšině fibrózním tumorózním stromatu. Tyto problémy se postupně daří překonávat a expresní analýzy u karcinomu pankreatu v současnosti probíhají na řadě pracovišť. Pilotní studie v rámci této dizertace je jedním z příkladů.

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Hlavním úkolem tohoto projektu bylo prostudovat vztahy mezi polymorfismy v genech metabolismu složek cigaretového kouře a alkoholu, jmenovitě *CYP2A13*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *ADH1B* a *ADH1C* a rizikem vzniku dvou nejvýznamnějších gastroenterologických nádorů z hlediska mortality - karcinomu kolorekta a pankreatu. Z mnoha výše zmíněných studií vyplývá vliv polymorfismů v genech pro biotransformační enzymy na riziko vzniku nádorového onemocnění u jejich nosičů. Vzhledem ke známým rizikovým faktorům jako je alkohol a kouření u rakoviny pankreatu zůstává otázkou, do jaké míry je vnímavost jedince k těmto látkám dána jeho genetickou výbavou, a jakou mírou se podílí složky vnějšího prostředí. Výskyt polymorfismů i životní styl v rámci různých populací se však může významně lišit a není známo jak tyto rozdíly riziko vzniku nádorů ovlivňují. Projekt měl za cíl ověřit hypotézu, zda alely kódující funkčně alterované biotransformační enzymy, které se podílejí na aktivaci prokarcinogenů, mají významnou úlohu pro vznik nádoru pankreatu a kolorekta v naší populaci, resp. zda je jejich výskyt u pacientů s nádory pankreatu odlišný od skupiny kontrolních osob bez nádorového onemocnění. V průběhu metabolismu, jak endogenních, tak i exogenních substrátů (např. tabákový kouř, etanol) vznikají v buňkách těla produkty se silnými biologickými účinky, tzv. volné radikály. Proto bylo cílem sledovat i vliv polymorfismů v genech kódující enzymy zapojené v metabolismu volných radikálů a oxidativního stresu, jako jsou *SOD2*, *SOD3*, *NQO1* a *NQO2*, a jejich významu pro vznik nádoru pankreatu a kolorekta.

V literatuře se uvádí, že pouze kolem 6% kolorektálních karcinomů a 4-16% karcinomů pankreatu patří k tzv. familiární formě, kdy jsou nalezeny zárodečné mutace v genech s vysokou penetrancí. Daleko větší podíl na genetické predispozici k nádorovým onemocněním mají pravděpodobně kombinace alterací genů s nízkou penetrancí. Jedním z intenzivně studovaných genů s nízkou penetrancí je *CHEK2* (checkpoint kinase 2) označovaný někdy také jako *CHK2*. V genu *CHEK2* bylo doposud popsáno několik inaktivujících mutací v souvislosti se vznikem jak hereditárních nádorových syndromů (Li-Fraumeni syndrom), tak i sporadických maligních nádorů (karcinom prsu, prostaty, štítné žlázy, osteosarkomu, apod.). Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda existuje vztah mezi vybranými funkčně významnými genetickými alteracemi *CHEK2* a rizikem vzniku kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu.

Rizikové faktory nádorových onemocnění jsou známy již řadu let, stejně jako nutnost vrozené vnímavosti jedince k jejich uplatnění v procesu vzniku nádorového onemocnění. Tato práce by mohla přispět k objasnění etiologie a molekulární patogeneze karcinomu pankreatu a kolorektálního karcinomu, zejména co se týče ovlivnění vnímavosti jedince k noxám vnějšího prostředí (gene-

environmental interaction). Případný objev zákonitostí by měl najít uplatnění v identifikaci rizikových skupin, na něž by bylo vhodné zaměřit primární prevenci formou úpravy životního stylu či chemoprevence. Rovněž sekundární prevence cílená k nalezení onemocnění v časných stádiích by zejména u pankreatu měla zcela zásadní význam pro úspěšnost jeho léčby.

Další hypotéza byla postavena na faktu, že pacienti s nádory odpovídají rozdílně na podanou chemoterapii. V řadě modelových systémů byly identifikovány geny interagující s účinkem cytostatik používaných pro léčbu karcinomu pankreatu. Rozdílné exprese těchto genů by tedy měly být jedním z důvodů pro vznik rezistence vůči chemoterapii. Studovanými geny byly zejména ABC transportéry. Záměrem této části studia bylo zjistit, zda jsou tkáně odebrané od pacientů s karcinomem slinivky vhodné pro expresní studie, a zda existují rozdíly v expresních profilech genů transportu cytostatik mezi tkáněmi nádorů a okolního nenádorového parenchymu, které by bylo možné využít pro hodnocení rozdílů mezi pacienty dobře odpovídajícími na léčbu (sensitivní) a těmi, kteří odpovídají minimálně, či vůbec (rezistentní). Změny v expresi genů podílejících se na transportu a metabolismu cytostatik podle dosavadních zkušeností mohou významně ovlivňovat výsledky léčby, a zejména v případě karcinomu pankreatu zatím existuje jen málo prací týkajících se této problematiky. Z literatury je spíše znám vliv řady genů na transformaci cytostatik studovaných na různých buněčných či zvířecích modelech. Současně ovšem je velmi málo prozkoumán význam těchto genů v dlouhodobém kontextu komplexní onkologické a onkochirurgické léčby indikované v moderních schématech (dle empirických zkušeností onkologů bez ohledu na farmakogenomiku). Racionalizace onkologické léčby je v současné době žádána i z důvodu omezených finančních zdrojů, které jsou na tuto velmi náročnou léčbu poskytovány zdravotním systémem. Získané výsledky by tedy mohly ovlivnit znalosti a zkušenosti s indikací této léčby v závislosti na vzniku chemorezistence a výskytu recidivy v průběhu komplexní onkologické léčby.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Biologický materiál

3.1.1. Vzorky krve pro izolaci DNA z periferních lymfocytů

Pro izolaci DNA z periferních lymfocytů byly použity vzorky venózní krve pacientů získané během standardních vyšetřovacích postupů pro danou diagnózu. Krev byla odebrána do sterilních vakuových zkumavek Vacuette (Dialab, Praha) s přísadou K3EDTA antikoagulancia a do zpracování skladována v -20°C.

Během let 2003 - 2009 byla postupně získána DNA z periferní krve 298 pacientů s diagnózou nádorového onemocnění slinivky břišní, 495 pacientů s kolorektálním karcinomem a 683 zdravých kontrol bez onkologického onemocnění. Všichni účastníci studií podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze v rámci grantových projektů IGA č. 9422-3 a GAČR 310/07/1430.

3.1.2. Krevní vzorky pacientů s nádorem slinivky břišní

Krevní vzorky pacientů se sporadickým adenokarcinomem slinivky břišní byly získány z šesti onkologických a chirurgických pracovišť v Praze a Příbrami. Do studie byli zahrnuti pouze pacienti, kteří splňovali alespoň jedno z následujících kritérií: (a) histologicky nebo cytologicky verifikovaný adenokarcinom pankreatu, nebo (b) alespoň tři klinické známky zhoubného nádoru slinivky břišní (přítomnost tumorózní masy zjištěna při ERCP, endoskopické ultrasonografii, CT nebo MR, výrazná ztráta hmotnosti spojená s anorexií a kachektizací, obstrukční ikterus). Z lékařské dokumentace byly ke vzorkům doplněny základní klinické a patologické informace (datum stanovení diagnózy, stádium nemoci hodnocené pomocí TNM klasifikace - stage, stupeň diferenciacie nádoru - grade a histologický typ nádoru). Všichni pacienti vyplnili s ošetřujícím lékařem osobní dotazník týkající se základních epidemiologických rizikových faktorů diskutovaných v souvislosti s tímto typem nádoru (pohlaví, věk, váha, BMI, rodinná a osobní onkologická anamnéza, přítomnost diabetu či pankreatitidy v osobní anamnéze, abusus- zejména kouření a příjem alkoholu, kávy, čaje, etc.).

3.1.3. Krevní vzorky pacientů s nádorem tlustého střeva a rekta

Krevní vzorky pacientů se sporadickým kolorektálním karcinomem byly získány z devíti onkologických pracovišť v Praze, Příbrami, Benešově u Prahy, Brně, Liberci, Ústí nad Labem a Zlíně. Do studie byli zařazeni pouze pacienti bez jiného chronického onemocnění s histologicky potvrzenou diagnózou. Všichni pacienti zařazení do studie vyplnili dotazník s informacemi o jejich vzdělání, bydlišti, životním stylu, BMI, abusu, diabetu, osobní a rodinné onkologické anamnéze.

3.1.4. Krevní vzorky kontrolní skupiny

Kontrolní skupina krevních vzorků byla nabírána ve stejném časovém období jako vzorky pacientů, s ohledem na věk a pohlaví subjektů. Jednalo se o jedince bez zhoubného nádorového onemocnění. Vzhledem k vysokému výskytu nádorů tlustého střeva v české populaci, byla kontrolní skupina 495 osob k pacientům s kolorektálním karcinomem vybrána ze subjektů s onkologicky negativní kolonoskopií. Všichni účastníci studií podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze v rámci grantového projektu GAČR 310/07/1430.

3.1.5. Vzorky tkáně pro izolaci DNA a RNA z nádorových a nenádorových buněk

Během let 2008-2010 byly získány vzorky tkání od 37 pacientů s podezřením na karcinom slinivky břišní, kteří podstoupili chirurgickou léčbu na Klinice transplantační chirurgie Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Z této skupiny bylo pro pilotní studii vybráno 10 pacientů s histologicky verifikovaným adenokarcinomem hlavy pankreatu. Vzorky byly okamžitě po resekci transportovány za sterilních podmínek na Pracoviště klinické a transplantační patologie IKEM k vyšetření tkáně. Po vyšetření a určení diagnózy byly části adenokarcinomu pankreatu a párové nenádorové okolní tkáně slinivky odděleny a zamrazeny v tekutém dusíku. Vzorky byly uchovány v -80°C až do procesu izolace RNA. U všech vzorků byly získány následující informace: pohlaví a věk pacientů, datum diagnózy, typ nádorů, stav okolní nenádorové tkáně (zdravý pankreas, chronická pankreatitida apod.), lokalizace, rozsah a velikost nádorů (stage dle TNM klasifikace), stupeň diferenciací (grade), přítomnost eventuální angioinvaze, počet postižených uzlin v okolní tukové tkáni, typ a radikalita resekce. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí při Thomayerově fakultní nemocnici a Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze v rámci grantového projektu GAČR P301/12/1734.

3.2. Izolace nukleových kyselin

3.2.1. Izolace DNA z periferních lymfocytů

Fenol/chloroformová extrakce

DNA skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem a kontrolní skupiny byla izolována pomocí fenol/chloroformové extrakce z lymfocytů metodou podle Sugimury [121].

Zamražená krev (cca 5 ml/vzorek) byla nejprve do rozmražení ponechána na ledu a následně přelita do 15 ml centrifugačních zkumavek a doplněna lyzačním pufrům (0,32 M sacharóza; 1% Triton; 50 mM MgCl₂; 12 mM Tris; pH=7,5) na celkový objem 14 ml. Lyzace probíhala za stálého otáčení 30 minut na rotačním ekstraktoru (Snijders B. V., Tilburg, Holandsko). Následně byly vzorky 15 minut centrifugovány při 6000 RPM a 5°C na centrifuze Hermle Z360K (Gosheim, Německo; r = 10 cm). Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována pomocí 4 ml sterilní MQ (Milli Q-destilovaná sterilizovaná voda) a znovu 15 minut centrifugována při 6000 RPM a 5°C s následným odstraněním supernatantu. Postup byl opakován s dalšími 4 ml MQ vody dokud peleta lymfocytů nebyla čistě bílá. K takto připravené peletě lymfocytů bylo přidáno 800 µl pufru pro proteinázu K (0,375 M NaCl; 0,12 M EDTA; pH=8,0), 25 µl proteinázy K (20 mg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), 100 µl 10% SDS, 1 ml 5 M NaCl a 2,4 ml sterilní MQ vody a opět promícháno 10 minut na rotačním ekstraktoru. Do každé zkumavky bylo ještě přidáno 2,5 ml extrakční směsi fenol/chloroform (v poměru 1:1) a vzorky byly opět promíchávány 15 minut na rotačním ekstraktoru. Poté proběhla centrifugace 15 minut při 6000 RPM a 5°C. Vrchní čirá fáze, obsahující DNA, byla přenesena do čisté 15 ml centrifugační zkumavky se 4 ml 99 % chladného etanolu ČSL2, kde se za opatrného promíchávání vytvořil precipitát DNA. DNA byla srážena v mrazicím boxu při -20°C přes noc. Poté byla zkumavka s DNA centrifugována 15 min. při 6000 RPM a 5°C, supernatant byl odstraněn a DNA byla promyta 1 ml vychlazeného 70% etanolu a centrifugována 15 minut za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu byla DNA sušena při pokojové teplotě. Vysušená peleta byla rozpouštěna v 1 ml sterilní MQ vody několik hodin a poté byla změřena koncentrace získané DNA. Vzorky byly uchovávány při -20°C.

Izolace DNA magnetickými partikulemi

Pro izolaci DNA z krve pacientů s nádorem pankreatu a kontrolní skupiny byl použit přístroj „KingFisher“ (Thermo electron corporation, Vantaa, Finsko) a kit BioSprint™, který obsahuje serinovou proteázu, magnetické partikule, AL pufr, AW1 pufr, AW2 pufr, AE pufr a plastové zkumavky (Qiagen, Německo). Metoda je založena na adsorpci makromolekul DNA na křemíkový povrch magnetických partikulí. DNA je navázána na povrch partikulí, které jsou promyty dvěma různými pufrů (AW1, AW2), sušeny proudem vzduchu a v konečném kroku je DNA eluována do

elučního roztoku (AE). Metoda je optimalizována na 1 ml plné krve s maximální kapacitou přístroje 15 vzorků.

Nejprve byl připraven lyzát smícháním 90 μ l Qiagen proteázy s 1 ml krve a krátce promíchán na vortexu (IKA-Works, Wilmington, USA). Následně bylo přidáno 900 μ l AL pufru, opět 15 sekund vortexováno a 10 minut inkubováno při 70°C v suchém bloku (Techne, Staffordshire, UK) a 900 μ l isopropanolu. Vše bylo 15 sekund vortexováno a 1 minutu centrifugováno při 5000 RPM na centrifuze Hermle Z360K. 1 ml lyzátu byl napipetován do první zkumavky z pěti zkumavek uvnitř přístroje KingFisher. Do zkumavky druhé byl napipetován 1 ml pufru AW1, do třetí a čtvrté zkumavky 500 μ l pufru AW2 a do poslední zkumavky 300 μ l elučního pufru AE. Do čtvrté zkumavky bylo přidáno 45 μ l zvortexované suspenze magnetických partikulí. Program pro izolaci DNA trval 45 minut. Tento postup byl opakován do vyčerpání lyzátu (při 1 ml krve dvakrát) a poté byla z poslední zkumavky odebrána eluovaná DNA a změřena její koncentrace. DNA byla do použití skladována při -20°C.

3.2.2. Izolace DNA z nádorové a kontrolní nenádorové tkáně

Pro izolaci DNA z tkáně bylo vyzkoušeno několik metod lišících se zejména ve složení lyzačního roztoku. Dále popisována metoda byla zvolena pro nejvyšší dosahovanou koncentraci DNA (μ g DNA/mg tkáně). Zmražená tkáň byla drcena ručně za použití keramického tloučku v předem vychlazené třecí misce s malým množstvím tekutého dusíku. Zhomogenizovaná tkáň byla přenesena do 2 ml sterilní plastové zkumavky a bylo přidáno 200 μ l sterilní MQ. Následně bylo přidáno 180 μ l lyzačního pufru (0,32 M sacharóza; 1% Triton; 50 mM MgCl₂; 12 mM Tris; pH=7,5), 200 μ l pufru pro proteinázu K (0,375 M NaCl, 0,12 M EDTA; pH=8) a 20 μ l proteinázy K (20mg/ml MQ), 4 μ l Rnázy A (100 mg/ml MQ). Poté byl vzorek umístěn na rotační extraktor, kde za stálého otáčení probíhala lyzace do druhého dne. Druhý den bylo ke vzorkům přidáno 200 μ l 5 M NaCl, 20 μ l 10% SDS a vše bylo opatrně promícháno opakovaným otáčením zkumavky a umístěno na 10 minut na rotační extraktor. Do každé zkumavky bylo ještě přidáno 0,5 ml extrakční směsi fenol/chloroform (v poměru 1:1) a vzorky byly opět promíchávány 15 minut na rotačním extraktoru. Poté proběhla centrifugace 15 minut při 8000 RPM a 4°C. Vrchní čirá fáze obsahující DNA byla přenesena do čisté sterilní 2 ml zkumavky s 1 ml 99 % chladného etanolu ČSL2, kde se za opatrného promíchávání vytvořil precipitát DNA. DNA byla srážena v mrazicím boxu při -20°C 30 minut. Poté byla zkumavka s DNA centrifugována 5 min. při 8000 RPM a 4°C, supernatant byl odstraněn a DNA byla promyta 0,5 ml vychlazeného 70% etanolu a centrifugována 5 minut za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu byla DNA sušena při pokojové teplotě 15-30 minut. Vysušená peleta byla rozpouštěna ve 100 - 500 μ l sterilní MQ několik hodin a poté byla změřena koncentrace získané DNA. Vzorky byly uchovávány při -20°C.

3.2.3. Izolace RNA z nádorové a kontrolní nenádorové tkáně

Se vzorky RNA bylo pracováno za přísně sterilních podmínek v boxu s laminárním prouděním a byl použit pouze plast neobsahující Rnázy a Dnázy. Před samotnou izolací byla tkáň podrcena mechanickou disrupcí v 1ml Trizolu (Invitrogen, Carlsbad, CA) pomocí homogonizátoru Precellys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) při rychlosti 6500 15 sec. Poté bylo přidáno 200 μ l chloroformu. Po krátkém a jemném zvortexování došlo k bílému zakalení vzorků, které byly následně 3 minuty inkubovány při pokojové teplotě (23°C). Při centrifugaci 15 minut při 12 000 RPM a 4°C došlo k rozdělení směsi na 3 přesně oddělené vrstvy: horní vodnou fázi obsahující RNA, střední bělavou vrstvu s DNA a proteiny a spodní vrstvu s trizolem a zbytkem buněčné drtě. Horní fáze s RNA byla přepitována do čisté 1,5 ml zkumavky a přidán stejný objem ledového isopropanolu. Po 10 minutách inkubace při pokojové teplotě následovala centrifugace 15 minut při 12 000 RPM a 4°C, při které vznikla bělavá peleta RNA při dolním pólu zkumavky. Vzorky byly promyty v 500 μ l 70% etanolu a znovu 5 minut centrifugovány za stejných podmínek. Poté byl etanol odebrán pipetou a peleta vysušena v suchém bloku při 60°C (Techne, Staffordshire, UK). Dle velikosti pelety bylo přidáno adekvátní množství MQ (40-100 μ l), aby došlo k jejímu rozpuštění. Získaná RNA byla rozaliquována po 20 μ l a zamražena při -80°C.

3.2.4. Kontrola kvantity a kvality nukleových kyselin

Kontrola kvantity a kvality RNA

Pro využití moderních molekulárně-biologických technik, jako je například qPCR nebo mikročipové technologie, je kvalita RNA klíčovým prvkem. Množství a integritu RNA ovlivňuje celá řada faktorů od charakteru tkáně a techniky odběru tkáně přes způsob transportu a skladování po techniku izolace a další manipulace se vzorky. Výrazně citlivé k degradaci jsou zejména dlouhé mRNA fragmenty (nad 10 kb). K degradaci RNA dochází v přítomnosti RNáz, které tkáň obsahuje, nebo kterými je vzorek zkontaminován v průběhu manipulace. Extrakce a purifikace celkové RNA musí splňovat následující kritéria [122, 123]:

- Nesmí být kontaminována proteiny (poměr absorpance 260 nm/ 280 nm by měl být nad 1,8)
- Nesmí být kontaminována genomovou DNA
- Neměla by být degradována (poměr 28S:18S by měl být mezi 1,8 - 2,0 s nízkým množstvím krátkých fragmentů)
- V případě využití pro reverzní transkripci a následnou PCR reakci by RNA neměla obsahovat inhibitory enzymů
- Nesmí obsahovat substance vytvářející komplexy s kofaktory PCR reakce jako jsou Mg^{2+} a Mn^{2+} ionty

- Nesmí obsahovat nukleázy

Tkáň slinivky břišní obsahuje velké množství RNáz, protože jsou hlavní součástí sekretu acinárních buněk této žlázy. Nicméně během infiltrace pankreatické tkáně nádorovými buňkami dochází k atrofii a destrukci žlázy [116].

Dříve byla využívána spektrofotometrie k měření jak koncentrace RNA (při vlnové délce 260 nm), tak i k ověřování její kvality (poměr 260/280 nm a 260/320 nm). V naší studii byla k měření koncentrace celkové RNA získané z tkání pankreatu využita novější fluorescenční metoda za využití Quant-iT™ RNA Assay Kitu (Invitrogen, Carlsbad, CA) a čtečky mikrodestiček Infinite M200 (Tecan, Vienna, Austria). Přístroj Infinite M200 umožňuje měřit fluorescenčně koncentraci RNA a dsDNA na principu vazby fluorescenčního RiboGreen a PicoGreen reagentia na nukleové kyseliny. Je to velmi citlivá metoda (až 1000x citlivější než měření absorbance), která navíc eliminuje příspěvek kontaminant, jako jsou bílkoviny a nukleotidy běžně přítomné ve vzorcích. Citlivost metody umožňuje měřit RNA v rozsahu 1 ng/ml – 1 µg/ml podle použití dvou různých koncentrací RiboGreen barvy (tzv. High Range Assay kvantifikuje množství 20 ng/ml – 1 µg/ml, Low Range Assay pak 1 ng/ml – 50 ng/ml). Excitační maximum Quanti-iT PicoGreen reagentia stejně jako i Quanti-iT RiboGreen reagentia je okolo 500 nm, proto bylo nastaveno emisní minimum na vlnovou délku 480 nm a emisní maximum na 520 nm dle doporučení výrobce.

Tři hodiny před samotným měřením byly připraveny pracovní roztoky:

- 1) 1x TE Buffer (20x naředěna komponenta B Quant-iT™ RNA Assay Kitu sterilní vodou bez RNáz a DNáz),
- 2) Quant-iT RiboGreen RNA Reagent Working Solution pro High Range Assay (200x naředěna komponenta A v roztoku 1xTE buffer),
- 3) Ribosomal RNA Standard Working Solution (2 µg/ml) pro High Range Assay (smícháno 4 µl RNA STD Stock (100 µg/ml) se 196 µl 1x TE buffer).

Vzorky RNA byly 200x naředěny (1 µl RNA + 199 µl 1x TE buffer). K 10 µl 200x naředěné RNA bylo přidáno 90 µl 1x TE pufru a 100 µl roztoku Quant-iT RiboGreen RNA Reagent Working Solution pro High Range Assay.

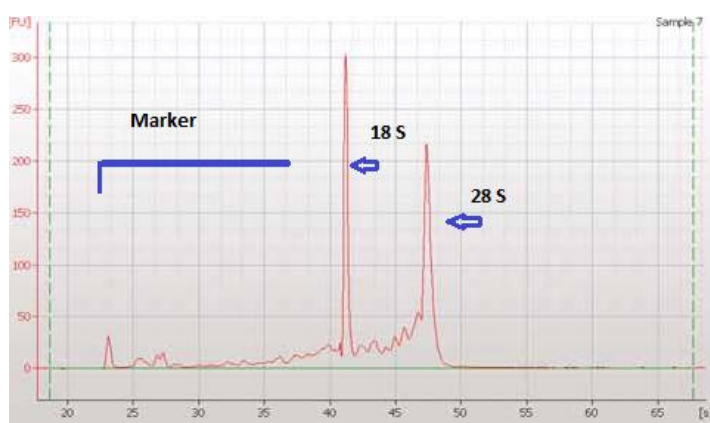
Pro výpočet výsledných koncentrací na základě fluorescenčních signálů bylo zapotřebí vytvořit kalibrační křivku pomocí 5-ti známých koncentrací naředěním roztoku Ribosomal RNA Standard Working Solution (2 µg/ml) pro High Range Assay, a k ní zobrazit rovnici regrese: $y = ax + b$, kde x je hledaná koncentrace v ng/ml (4000x ředěné RNA) a y jsou hodnoty fluorescence pro jednotlivé vzorky po odečtení fluorescence vzorku bez RNA (blank).

Korelační koeficient R^2 byl ve všech měřeních $\geq 0,998$. Graf s kalibrační křivkou a výpočty byly vytvořeny v programu Microsoft Excel.

Naměřené koncentrace celkové RNA získané z tkání se pohybovaly v rozmezí 0,25 - 5,51 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

K ověření kvality RNA bylo využito moderní metody stanovení tzv. RNA Integrity Number (RIN) na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) s využitím RNA Nano 6000 LabChip kitu (Agilent Technologies). Tento mikrofluidový čipový systém provádí elektroforézu celkové RNA procesem velmi podobným tradiční gelové elektroforéze, ale dokáže miniaturizovat a kombinovat několik kroků: separaci, barvení, zobrazení a analýzu dat v jednom automatizovaném procesu. Proto by měly být výsledky shodné bez ohledu na to, ve které laboratoři měření probíhá a reprodukovatelné na rozdíl od klasické elektroforézy.

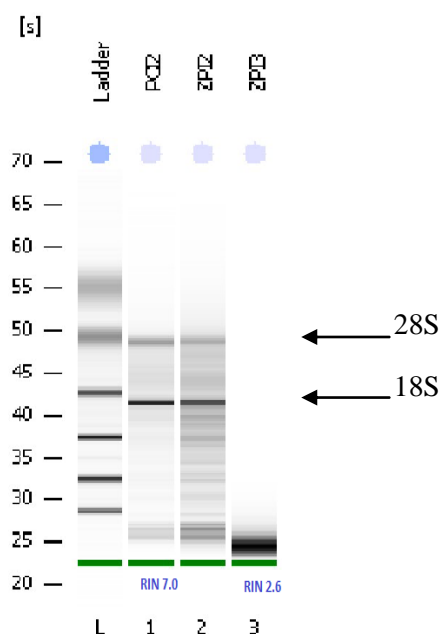
Obrázek č. 8: Záznam stanovení kvality RNA na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer



Legenda: Agilent 2100 expert software; osa x: čas měření (s); osa y: intenzita normalizované fluorescence.

Všechny komponenty RNA Nano 6000 LabChip kitu byly ponechány 30 minut při pokojové teplotě. Poté byl připraven gel centrifugací 550 μl Agilent RNA 6000 Nano gel Matrixu přes filtr ve speciální zkumavce (součást kitu) v minicentrifuze. Gel Dye mix vznikl smícháním 1 μl RNA 6000 Nano dye koncentrátu s 65 μl připraveného gelu. Mix byl po důkladném zvortexování stočen na centrifuze 10 minut při 14000 RPM, nanesen v množství 9 μl na 6000 Nano Chip do pozice „G“ a rozprostřen po celé délce chipu pomocí výrobcem dodávané stříkačky. Do všech 12 jamek pro stanovování vzorků a do jamky pro ladder bylo nanesen 5 μl RNA 6000 Nano markeru. RNA ladder i vzorky RNA byly zdenaturovány 2 minuty za teploty 70°C a rozpipetovány na čip po 1 μl . Čip byl umístěn v horizontální poloze do IKA vortexu (Model MS2-S8/MS2-S9) na 60 sekund při 2400 RPM. Takto připravený chip byl k analýze integrity RNA umístěn do přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer a zhodnocen pomocí výrobcem dodávaného softwaru Agilent 2100 expert software Revision B.02.02.

Obrázek č. 9: Elektroforetický záznam pro stanovované vzorky



Legenda: Agilent 2100 expert software; osa x: počet vzorků; osa y: čas (s). Vzorek PCI2 s RINem 7.0- je vidět mírná degradace proužků odpovídajících 18S a 28S RNA; Vzorek ZPI3 s RINem 2.6- nejsou zachyceny proužky odpovídající svou velikostí 18S a 28S RNA.

Kontrola kvantity a kvality DNA

Posledním krokem izolace DNA bylo u obou metod (fenol/chloroformová extrakce, KingFisher) měření její koncentrace a čistoty na spektrofotometru Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA). Absorbance byla měřena formou spektra při vlnových délkách 230 - 320 nm. Poměr A_{260}/A_{280} se pohyboval mezi 1,6 - 2,0. Pro výpočet koncentrace byla použita rovnice:

$$c = 50 \times A_{260-320} \times n \quad (c = \text{koncentrace v } \mu\text{g/ml}, n = \text{ředění vzorku při měření koncentrace}).$$

Dosažené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 20 - 500 $\mu\text{g DNA/ml}$. Pro následující PCR reakce byly vzorky naředěny na koncentraci 2 $\mu\text{g DNA}/100\mu\text{l}$ a skladovány při teplotě -20°C .

Nakonec byly koncentrace ověřeny metodou za využití Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kitu (Invitrogen, Carlsbad, CA) a Infinite M200 (Tecan, Vienna, Austria) - viz. výše v kapitole: Kontrola kvality a kvantity RNA, str.31-33.

3.3. Stanovení polymorfismů v genech kódující biotransformační enzymy

V této práci bylo ke genotypování, tedy ke sledování genetických polymorfismů využito dvou metod. Polymorfismy v genech *EPHX1*, *GSTP1*, *CYP2A13*, *ADH1B*, *ADH1C*, *SOD2*, *SOD3*, *NQO1*, *NQO2* (viz. Tabulka 2) byly stanoveny pomocí real-time polymerázové řetězové reakce na přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie) s využitím fluorescenčně značených sond TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). Druhou metodou byla klasická polymerázová řetězová reakce (PCR) s následnou analýzou délky restričních fragmentů a alel-specifické PCR (*GSTM1*, *GSTT1* a *GSTP1*, Tabulka 2).

3.3.1. Stanovení genetických polymorfismů pomocí polymerázové řetězové reakce s následnou analýzou délky restričních fragmentů

Polymerázová řetězová reakce je využívána k amplifikaci zkoumaného úseku DNA. Mezi základní reakční složky reakce patří templát (DNA), termostabilní Taq polymeráza, reakční pufr Taq polymerázy, chlorid hořečnatý ($MgCl_2$), deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP) a dva specifické oligonukleotidy (primery). Pro navržení primerů je nezbytné znát sekvence zkoumané DNA, na kterou nasedají primery. Sekvence byly zjištěny v internetové databázi GeneBank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

PCR reakce obvykle probíhá ve třech po sobě jdoucích krocích, které tvoří jeden cyklus:

- 1) Denaturace DNA při 94°C obvykle 30 sec.
- 2) Annealing: nasednutí primerů při teplotě blízké teplotě tání komplementárního úseku DNA a při koncentraci hořečnatých iontů specifické pro každou PCR reakci – tuto teplotu je třeba experimentálně zjistit.
- 3) Elongace: prodlužování dceřiných řetězců Taq polymerázou při teplotě 72°C po dobu 30 – 60 sec podle délky amplikonu.

Reakce probíhaly v termocyleru GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), chemikálie byly před použitím protřepány a centrifugovány v minicentrifuze C1301 (Labnet, USA; dodavatel KRD s.r.o., Praha). Jednotlivé PCR reakce se lišily počtem opakování cyklů (20-35), annealing teplotami a délkou jednotlivých kroků reakce nebo koncentrací reakčních složek.

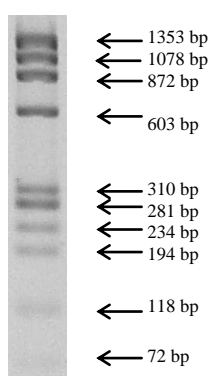
Obecné podmínky PCR reakce:

Celkový objem každé PCR reakční směsi byl 25 μ l (20 μ l mixu + 5 μ l ředěné DNA v ředění 20 ng/ μ l MQ). Jednotlivé složky reakcí byly následující: 1,8 mM $MgCl_2$ (Top-Bio, Praha), 0,2 mM deoxynukleotidy ve směsi (Jena Bioscience, Německo), 0,25 mM forward i reverse primery (Sigma-

Aldrich, Steinheim, Německo), Taq-Purple DNA polymeráza z *Thermus aquaticus* 0,5 U/vzorek, 10x reakční pufr Top-Bio Complete pro stanovení polymorfismů *GSTMI* a 10x reakční pufr Top-Bio bez $MgCl_2$ pro ostatní PCR reakce (Top-Bio, Praha), sterilní destilovaná voda (MQ).

Kontrola PCR produktů byla prováděna pomocí horizontální agarózové elektroforézy ve 2 - 3% gelu. Pro přípravu gelu byly využity analytické váhy (Boeco, Hamburg, Německo) a agaróza byla v roztoku 0,5x TBE pufru zahřívána nad bod tání v mikrovlnné troubě. Na gel bylo vždy nanášeno 8 μ l PCR produktu. Jako marker délky fragmentů DNA byl použit Phi174/HaeIII - obrázek č. 10 (New England Biolabs MA, USA; dodávané firmou Biotech s.r.o., Praha, ČR).

Obrázek č. 10: Marker délky fragmentů Phi174/HaeIII



Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně (Jordan Scientific Inc. dodané Biotech s.r.o., Praha, ČR) 30 - 50 minut v 0,5x ředěném pufru TBE /0,045 M Trizma, 0,045 M H_3BO_3 , 1 mM EDTA/ (Sigma, St. Louis, MO, USA); pH 8,0/ při napětí 100V (zdroj EC-105, Thermo EC, NY, USA dodáno KRD s.r.o., Praha, ČR). Gel byl poté barven ve vodném roztoku ethidium bromidu o koncentraci 10 μ g/ml (Sigma) 15 - 25 minut. Fragmenty DNA byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru (Sigma) a dokumentačního systému Kodak EDAS 290 (KRD s.r.o., Praha, ČR). Pokud kontrola produktů proběhla v pořádku, byl zbytek PCR směsi, obsahující amplicon *GSTPI*, podroben restriční analýze (RFLP). RFLP je založena na použití restričních endonukleáz, které rozeznávají specifickou sekvenci bází (obvykle čtyř až osmi deoxynukleotidů) amplifikovaného PCR úseku a specificky ji štěpí. Pro genotypování byla použita endonukleáza specifická pro očekávaný polymorfismus (*BsmAI*). Pokud tedy bylo v sekvenci přítomno polymorfní místo, endonukleáza jej rozeznala a PCR produkt naštěpila. Restriční reakce probíhaly při optimální teplotě pro aktivaci *BsmAI*, tj. při 55°C v inkubátoru (Major Science, Saratoga, CA).

Složení restrikční směsi:

Celkový objem reakční směsi byl 20 µl (5µl restrikčního mixu + 15µl PCR směsi). Jednotlivé složky restrikčního mixu byly následující *BsmAI* (1 - 2 U/vzorek), 10x restrikční pufr (New England Biolabs, MA, USA) a MQ. Délka a teplota restrikce: 2 hodiny při 55°C.

Výsledky restrikce byly zjištěny pomocí horizontální elektroforézy nanesením celkového množství restrikční směsi (20 µl) na 3% agarózový gel, který byl obarven ethidium bromidem (15 - 25 minut). Výsledek byl zaznamenán pomocí UV transluminátoru a dokumentačního systému Kodak EDAS 290. K určení velikosti DNA fragmentů byl použit standard Phi174/HaeIII.

Výsledek genotypování pomocí PCR-RFLP spočíval v určení velikosti fragmentů a toho, zda daný jedinec je ve sledovaném genu: divoký homozygot (obě alely nenaštěpeny) značen kódem 1, heterozygot (naštěpena jedna alela) značen kódem 2 nebo variantní homozygot (obě alely naštěpeny) značen kódem 3. V případě *GSTM1* a *GSTT1* byla sledována pouze přítomnost (1) či delece (3) alely.

Podrobné reakční podmínky a odlišnosti od obecných podmínek reakce jsou pro každý sledovaný polymorfismus uvedeny.

Genotypování glutation S-transferázy M1

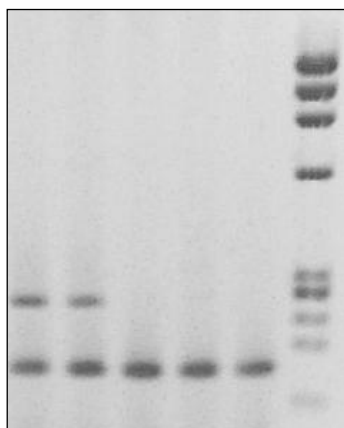
Genotypování *GSTM1* probíhalo pomocí alel specifického PCR. Jako pozitivní kontrola PCR reakce byl použit *GSTM2*, jehož přítomnost vypovídá o správném průběhu reakce. *GSTM2* má společný primer (forward) s *GSTM1*. Nepřítomnost fragmentu *GSTM1* (a současně přítomnost standardu *GSTM2*) znamená delecii v obou alelách *GSTM1*, jedná se tedy o variantního homozygota. Stanovení není schopno rozlišit divoké homozygoty a heterozygoty. Pokud je tedy přítomen fragment odpovídající *GSTM1* znamená to, že daný jedinec má k dispozici alespoň jednu funkční alelu.

Tabulka č. 4: Podmínky PCR pro genotypování *GSTM1*

Gen	<i>GSTM1</i>	<i>GSTM2</i>
Polymorfismus	OMIM: 138350 (delece)	
Primer forward	5'- CTG CCC TAC TTG ATT GAT G -3'	5'- CTG CCC TAC TTG ATT GAT G -3'
Primer reverse	5'- CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC -3'	5'- GAC TCA CTC TGA GCA TAG CAC -3'
Program PCR	30 sec 94°C//20 cyklů: 30 sec 94°C a 30 sec 68 – 48°C/ 30 sec 72°C// 15 cyklů: 30 sec 94°C a 30 sec 52°C/ 30 sec 72°C// 5 min 72°C//	
Velikost produktu	275 bp	175 bp (kontrola PCR reakce)

Obrázek č. 11: Určení genotypu *GSTM1* podle velikosti fragmentů z 3% agarózového gelu

1 1 3 3 3 MW



- 1) divoký homozygot nebo heterozygot (*GSTM1-plus*): přítomnost fragmentu 275 bp (+ 175 bp *GSTM2*)
- 3) variantní homozygot (*GSTM1-null*): nepřítomnost fragmentu 275 bp (+ 175 bp *GSTM2*)
- MW - marker Phi174/HaeIII

Genotypování glutation S-transferáz T1 a P1

Genotypy *GSTP1* a *GSTT1* byly stanoveny v jedné reakci. Pro *GSTT1* byla stanovena delece či přítomnost alel. Jako pozitivní standard v případě delece alely *GSTT1* sloužil přítomný fragment *GSTP1*. Stejně jako při genotypování *GSTM1* není stanovení schopno rozlišit normální homozygoty a heterozygoty, pokud je tedy přítomen fragment odpovídající délce fragmentu *GSTT1* znamená to, že daný jedinec má k dispozici aspoň jednu funkční alelu.

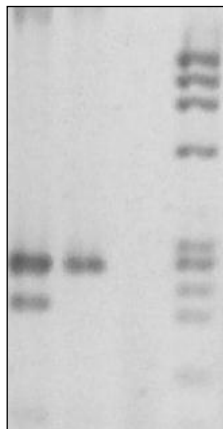
Pro určení delece *GSTT1* bylo použito 8 µl PCR produktu naneseného na 3% gel. Poté byla se zbývajícím množstvím PCR směsi provedena restrikce a stanoven genotyp *GSTP1*.

Tabulka č. 5: Podmínky PCR a RFLP pro genotypování *GSTT1* a *GSTP1*

Gen	<i>GSTP1</i>	<i>GSTT1</i>
Polymorfismus	rs: 1695	OMIM: 600436 (delece)
Primer forward	5'- TCC TTC CAC GCA CAT CCT CT - 3'	5'- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC - 3'
Primer reverse	5'- AGC CCC TTT CTT TGT TCA GC - 3'	5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA - 3'
Program PCR	30 sec 94°C//35 cyklů: 30 sec 94°C a 30 sec 54°C/ 30 sec 72°C// 5 min 72°C//∞ 4°C	
Velikost produktu	294 bp	217 bp
Restrikční enzym	BsmAI (2U/vzorek)	---
Restrikční místo	5'...GTCTC(N)1 ▼ ...3' 3'...CAGAG(N)5 ▲ ...5'	---
Program RFLP	2 hodiny při 55°C	---
Velikost produktů	234 bp a 60 bp	---

Obrázek č. 12: Určení genotypu GSTT1 dle velikosti fragmentů z 3 % agarózového gelu

1 3 C MW

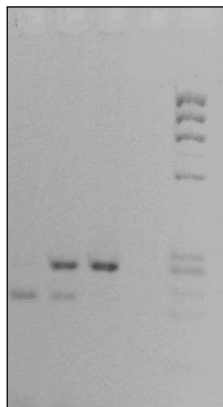


← 310 bp
← 281 bp
← 234 bp
← 194 bp

- 1) divoký homozygot nebo heterozygot (*GSTT1-plus*): přítomnost fragmentu 217 bp (+294 bp *GSTP1*)
- 3) variantní homozygot (*GSTT1-null*): nepřítomnost fragmentu 217 bp (+294 bp *GSTP1*)
- C - negativní kontrola bez DNA - žádný produkt
- MW - marker Phi174/HaeIII

Obrázek č. 13: Určení genotypu GSTP1 dle velikosti fragmentů z 3 % agarózového gelu

1 2 3 MW



← 310 bp
← 281 bp
← 234 bp
← 194 bp

- 1) divoký homozygot (Ile105Ile): 294 bp
- 2) heterozygot (Ile105Val): 294 bp + 234 bp (+ 60 bp)*
- 3) variantní homozygot (Val105Val): 234 bp (+ 60 bp)*
- MW - marker Phi174/HaeIII

*díky malé velikosti není nejmenší fragment viditelný

3.3.3. Statistická analýza

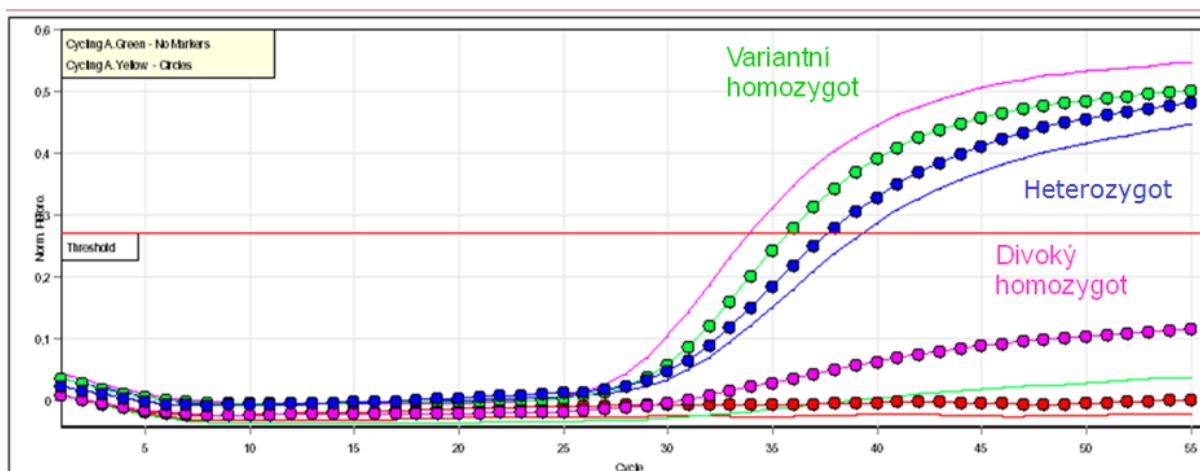
Významnost výsledků byla hodnocena statistickým programem SPSS v15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Pro jednoduché analýzy vztahů mezi polymorfismy a klinickými i osobními daty participantů byl použit Pearsonův chi-kvadrát test. Spojité vztahy byly hodnoceny ANOVA testem a Pearsonovou korelací. Pro multiparametrické hodnocení vztahů byla využita logistická regrese adjustovaná na vybrané faktory životního stylu. Rozdíly a vztahy dosahující hladiny významnosti nižší než 0,05 (všechny testy použity jako oboustranné) byly považovány jako statisticky významné a prezentovány ve výsledkové části.

3.3.2. Stanovení genetických polymorfismů pomocí Real-Time polymerázové řetězové reakce

Real-time PCR je metoda založená na principu PCR s využitím fluorescence, prostřednictvím které je monitorován vznik PCR produktu v reálném čase. Stanovení probíhalo v pěti-kanálovém přístroji Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie), s využitím dvou kanálů (FAM a VIC viz. dále), a sond TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays. Tyto sondy jsou specificky navržené duálně značené oligonukleotidy, pracující na principu rezonančního přenosu energie mezi fluorescenčně značeným (FRET - „fluorescence resonance energy transfer“) emitorem záření (fluorofor) na 5'-konci a zhášečem záření (quencher) na 3'-konci sekvence sondy. Fluorescenční látka a zhášeč záření jsou na sondě umístěny v takové vzdálenosti, při které nedochází k emisi fluorescence. Taq polymeráza při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje navázanou sondu (5'→3' exonukleázová aktivita) a dochází k separaci fluoroforu od zhášeče a k následnému nárůstu fluorescence v každém cyklu PCR. Měřený nárůst fluorescence přímo odpovídá množství přítomného amplikonu.

K určení genotypů byla použita metoda alelické diskriminace s dvěma typy Taqman sond. Pro variantní sekvenci byla použita sonda s emitorem záření FAM a pro divokou sekvenci sonda s emitorem záření VIC. Oba emitory mají rozdílná emisní maxima, takže jsou fluorescenční signály detekovány v rozdílných kanálech. K hodnocení výsledků byl použit software Rotor-Gene verze 6.0 (Corbett-Research, Brisbane, Australia), který srovnáním signálů v obou kanálech rozdělil vzorky do skupin odpovídajících jednotlivým genotypům.

Obrázek č. 13: Výstupní fluorescenční záznam real-time PCR pokusu pro jednotlivé genotypy *ADH1C*



Legenda: software Rotor-Gene verze 6.0; osa x: počet cyklů; osa y: intenzita normalizované fluorescence; signál od FAM značené sondy, resp. divokou alelu reprezentuje hladká křivka; signál od VIC značené sondy resp. variantní alelu reprezentuje křivka s body. Divoký homozygot (růžově) vykazuje signál v kanále detekujícím FAM, variantní homozygot (zeleně) vykazuje signál v kanále detekujícím VIC, heterozygot (modře) má signál v obou kanálech, negativní kontrola (červeně) nemá signál ani v jednom kanále.

Reakční směs (celkový objem 10 μ l) pro real-time PCR obsahovala 5 μ l 2x TaqMan Universal PCR Master mixu (Applied Biosystems) pro *CYP2A13*, *ADH1C*, *GSTP1* a SNP v kodonu 3 *EPHX1* nebo 5 μ l ABSolute QPCR ROX mixu (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Il) pro ostatní geny, 0,25 μ l TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (primery a sondy navržené výrobcem, Applied Biosystems) a 4,75 μ l DNA teplátu. DNA do reakční směsi byla naředěna na koncentraci 0,7 ng/ μ l. V každé reakci byla přítomna negativní kontrola, kde DNA templát byl nahrazen sterilní vodou, k vyloučení možnosti kontaminace reakční směsi. 10% vzorků bylo reanalyzováno se 100% shodou ve výsledném hodnocení genotypů.

Tabulka č. 6: Optimalizované podmínky PCR reakce pro jednotlivé sondy

Gen	ID dbSNP	ID TaqMan Assay	Optimalizovaný program pro PCR reakci
<i>ADH1B</i>	rs1229984	C_2688467_20	15 min 95°C//50 cyklů: 15 sec 95°C a 60 sec 62°C
<i>ADH1C</i>	rs698	C_26457410_10	10 min 95°C//55 cyklů: 15 sec 92°C a 90 sec 58°C
<i>CYP2A13</i>	rs72552266	C_30634006_10	10 min 95°C//55 cyklů: 15 sec 92°C a 90 sec 58°C
<i>EPHX1</i>	rs1051740	C_14938_30	10 min 95°C//50 cyklů: 15 sec 92°C a 90 sec 60°C
<i>EPHX1</i>	rs2234922	C_11638783_30	15 min 95°C//55 cyklů: 15 sec 95°C a 60 sec 62°C
<i>GSTP1</i>	rs1695	C_3237198_20	10 min 95°C//50 cyklů: 15 sec 92°C a 90 sec 60°C
<i>NQO1</i>	rs1800566	C_2091255_30	15 min 95°C//50 cyklů: 15 sec 95°C a 60 sec 60°C
<i>NQO2</i>	rs1143684	C_8774861_10	15 min 95°C//50 cyklů: 15 sec 95°C a 60 sec 62°C
<i>SOD2</i>	rs4880	C_8709053_10	15 min 95°C//50 cyklů: 15 sec 95°C a 15 sec 64°C
<i>SOD3</i>	rs1799895	C_2307506_10	15 min 95°C//50 cyklů: 15 sec 95°C a 60 sec 60°C

3.4. Stanovení mutací v genu CHEK2

Genetické alterace v FHA doméně (fork head-associated domain) kódující exony 2 a 3 spolu s introny 1 - 3 a mutace 1100delC genu *CHEK2* byly stanoveny pomocí denaturační vysokotlaké kapalinové chromatografie (DHPLC) spolupracujícím pracovištěm (Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK, Praha). Nalezené alterace byly potvrzeny pomocí sekvenace DNA z nezávislých PCR produktů [124, 125].

Přítomnost rozsáhlé genomické delece 5395 bp v exonech 8 a 9 byla analyzována PCR metodou.

Tabulka č. 7: Podmínky PCR pro sledování del5395 v *CHEK2*

Gen	<i>CHEK2</i>	<i>CHEK2</i>
Polymorfismus	OMIM: 604373 (delece)	Kontrolní fragment divoké alely pro kontrolu PCR
Primer forward	5'- GAACCACTATTTACATAAC – 3'	5'- GAACCACTATTTACATAAC – 3'
Primer reverse	5'- GTCTCAAACCTGGCTGCG – 3'	5'- CAAGACACTGAAAGATACTC – 3'
Program PCR	3 min 94°C//10cyklů: 30 sec 94°C a 30 sec 65-55°C/ 30 sec 72°C// 25cyklů: 30 sec 94°C a 30 sec 58°C/30 sec 72°C	3 min 94°C//10cyklů: 30 sec 94°C a 30 sec 60-50°C/30 sec 72°C//25cyklů: 30 sec 94°C a 30 sec 58°C/30 sec 72°C
Produkt	292bp	162bp

Kontrola PCR produktů byla prováděna pomocí horizontální agarózové elektroforézy ve 2% gelu. Pro přípravu gelu byly využity analytické váhy (Boeco, Hamburg, Německo) a agaróza byla v roztoku 0,5x TBE pufru zahřívána nad bod tání v mikrovlné troubě. Na gel bylo vždy naneseno 10 µl PCR produktu. Jako marker délky fragmentů DNA byl použit Phi174/HaeIII - obrázek č. 10 (New England Biolabs MA, USA; dodávané firmou Biotech s.r.o., Praha, ČR).

3.5. Relativní kvantifikace míry exprese genů pomocí real-time PCR metody

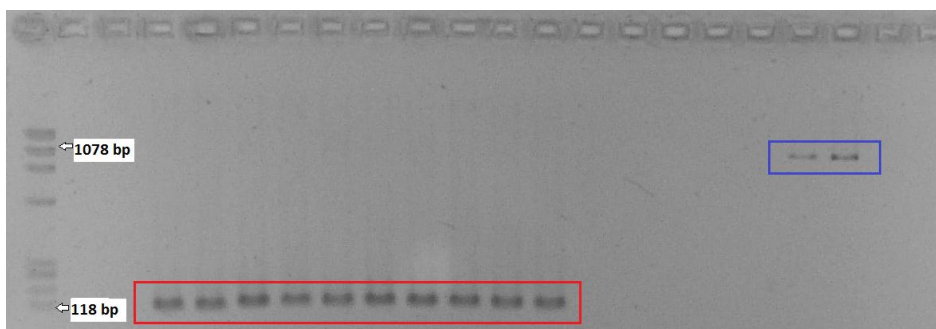
3.5.1. Syntéza cDNA s PCR kontrolou produktů

Vzorky RNA s RIN > 2.0 byly dále využity k syntéze cDNA pomocí RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kitu s hexamer primery (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). Se vzorky RNA bylo pracováno za přísně sterilních podmínek v boxu s laminárním prouděním a byl použit pouze plast od výrobce neobsahující Rnázy ani Dnázy. Vzorky byly při zpracování uchovávány ve vychlazených stojácích.

K 2 µg RNA byly přidány 4 µl hexamer primerů (0,2 ug/ul) a sterilní voda (Nuclease-Free Water, Ambion) do objemu 56 µl. Reakční směs byla po důkladném promíchání a centrifugaci v minicentrifuze ponechána 5 minut při 70° C v inkubátoru. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 16 µl 5x pufu, 8 µl 10 mM směsi deoxynukleotidů a 4 ul inhibitoru RNAsy. Vše bylo opět po promíchání a centrifugaci ponecháno 5 minut při pokojové teplotě. Následně bylo z každého vzorku odebráno 8 µl do čisté sterilní zkumavky jako negativní kontrola bez enzymu reverzní transkriptázy. Ta byla k vzorkům přidána v množství 4 ul (200 U/ul). Inkubace probíhala 10 minut při pokojové teplotě a potom dalších 60 minut při 42°C. Enzym byl inaktivován inkubací vzorků 10 minut při teplotě 70°C.

Celkový objem získané cDNA byl 80 µl. Při teoretické 100% úspěšnosti reverzní transkripce byla koncentrace takto připravené cDNA 25 ng/µl. Kvalita cDNA z hlediska kontaminace genomovou DNA byla ověřena pomocí PCR amplifikace fragmentu ubiquitinů C (UBC). Produkt amplifikace cDNA je pouze 190 bp velký, protože neobsahuje intron na rozdíl od produktu amplifikace genomové DNA, který obsahuje 1009 párů bází. Všechny vzorky bez kontaminace DNA byly uskladněny při -20°C.

Obrázek č. 14: Kontrola kontaminace cDNA genomovou DNA za pomoci PCR amplifikace fragmentu ubiquitinů C



Legenda: 3% agarózový gel barvený etidium bromidem. V první pozici marker Phi174/HaeIII (New England Biolabs MA, USA). V pozicích 4 - 13 je produkt o velikosti 109 bp - jedná se o vzorky cDNA (červeně zvýrazněny). V pozicích 14-22 jsou negativní kontroly bez přidání reverzní transkriptázy. Modře jsou zvýrazněny 2 vzorky mírně kontaminované genomovou DNA - produkt o velikosti 1009 bp.

3.5.2. Výběr stabilních referenčních genů

Pro qPCR je velmi důležitá volba vhodných vnitřních standardů (tzv. referenčních genů). V ideálním případě jsou tyto referenční geny konstitutivně exprimovány ve všech buněčných typech dané studie, měly by být zcela nezávislé na podmínkách probíhajících experimentů a neovlivitelné zdravotním stavem jedinců ve studii. V posledních letech byly jako tyto referenční geny obvykle používány tzv. „housekeeping“ geny, což jsou geny nepostradatelné pro přežití buněk. Jako příklad lze uvést glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu (*GAPDH*), ribosomální RNA podjednotky (18S and 28S rRNA), β -aktin, nebo cyklofiliny. Nicméně se ukázalo, že tyto populární a běžně užívané geny vykazují značné rozdíly v expresi mezi různými druhy tkání a zejména mezi tkání zdravou a nádorovou [117-119]. Proto byly před samotnou relativní kvantifikací genové exprese transportérů vybrány vhodné referenční geny pro námi sledované malignity a skupiny pacientů.

Kvantitativní real-time PCR

qPCR byla stanovena pomocí přístroje 7500 Real-Time PCR System s pomocí TaqMan® Custom Plates (Applied Biosystems), v nichž jsou ve volitelném formátu v jednotlivých jamkách nanášeny lyofilizované primery a sondy pro stanovení jednotlivých genů. Pro analýzu 24 kandidátních referenčních genů byl použit formát plat: 4x24, sestavený ze setu TaqMan® Gene Expression Assays s optimalizovanými próbami a primery (tabulka č. 8). TaqMan® Gene Expression Assays byly vybrány podle následujících kritérií:

- vazba sondy na cDNA v místě rozhraní exon-exon minimalizující falešný signál v případě stopové kontaminace genomovou DNA
- nejkratší možná velikost ampliconů
- lokalizace ampliconů blízko 3'-konce transkriptu snižující vliv rozdílné kvality RNA.

Přednostně byly použity geny z ověřeného seznamu endogenních kontrol firmy Applied Biosystems. Seznam referenčních genů a k nim vybrané Assays jsou blíže popsány v tabulce č. 9.

Tabulka č. 8: Rozložení genů na platcích navržených pro výběr referenčních genů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	ACTB	B2M	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	ACTB	B2M
B	HMBS	IPO8	PGK1	TBP	TFRC	YWHAZ	HMBS	IPO8	PGK1	TBP	TFRC	YWHAZ
C	PPIA	POLR2A	GADD45A	EIF2B1	ABL1 BCR	ELF1	PPIA	POLR2A	GADD45A	EIF2B1	ABL1 BCR	ELF1
D	MRPL19	PES1	RPL30	RPS17	POP4	PSMC4	MRPL19	PES1	RPL30	RPS17	POP4	PSMC4
E	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	ACTB	B2M	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	ACTB	B2M
F	HMBS	IPO8	PGK1	TBP	TFRC	YWHAZ	HMBS	IPO8	PGK1	TBP	TFRC	YWHAZ
G	PPIA	POLR2A	GADD45A	EIF2B1	ABL1 BCR	ELF1	PPIA	POLR2A	GADD45A	EIF2B1	ABL1 BCR	ELF1
H	MRPL19	PES1	RPL30	RPS17	POP4	PSMC4	MRPL19	PES1	RPL30	RPS17	POP4	PSMC4

Celkový objem každé reakce byl 20 μ l a sestával se z 10 μ l cDNA a 10 μ l 2x TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). Do každé jamky dřívě popsaného plata bylo napipetováno množství cDNA odpovídající 25ng celkové RNA, použité k její syntéze. Poté proběhla PCR reakce za následujících podmínek: 2 min. při 50°C, následovala iniciální denaturace 10 minut při 95°C, a 50 cyklů střídavé denaturace 15 sec při 95°C a annealing s elongací 60 sec při teplotě 60°C.

Tabulka č. 9: Informace o stanovovaných referenčních genech a k nim vybraným assayím

Gen (ID)	Assay ID	Lokalizace próby*	Délka (bp) “	Název genu
<i>GAPDH</i> (2597)	Hs02758991_g1	3'-konec, rozhraní exon 7 - 8	93	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>HPRT1</i> (3251)	Hs99999909_m1	3'-konec, rozhraní exon 6 - 7	100	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
<i>GUSB</i> (2990)	Hs99999908_m1	3'-konec ,rozhraní exon 11- 12	81	glucuronidase, beta
<i>ACTB</i> (60)	Hs00357333_g1	rozhraní exon 1 - 2	77	actin, beta
<i>B2M</i> (567)	Hs99999907_m1	3'-konec, rozhraní exon 2 - 3	75	beta-2-microglobulin
<i>HMBS</i> (3145)	Hs00609297_m1	3'-konec, rozhraní exon 1 - 2	64	hydroxymethylbilane synthase
<i>IPO8</i> (10526)	Hs00183533_m1*	3'-konec, rozhraní exon 20 - 21	71	importin 8
<i>PGK1</i> (5230)	Hs00943178_g1*	3'-konec, rozhraní exon 5 - 6	73	phosphoglycerate kinase 1
<i>TBP</i> (6908)	Hs00427621_m1*	rozhraní exon 3 - 4	65	TATA box binding protein
<i>TFRC</i> (7037)	Hs99999911_m1	exon 14	105	transferrin receptor
<i>YWHAZ</i> (7534)	Hs00237047_m1	rozhraní exon 1 - 2	70	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
<i>PPIA</i> (5478)	Hs01565700_g1	rozhraní exon 3 - 4	94	peptidylprolyl isomerase A
<i>POLR2A</i> (5430)	Hs00172187_m1*	3'-konec, rozhraní exon 1 - 2	61	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A
<i>GADD45 A</i> (1647)	Hs00169255_m1*	rozhraní exon 3 - 4	123	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
<i>EIF2B1</i> (1967)	Hs00426752_m1*	3'-konec, rozhraní exon 4 - 5	75	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha
<i>ABL1</i> (25)	Hs00245445_m1	rozhraní exon 3 - 4	91	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
<i>ELF1</i> (1997)	Hs00152844_m1*	3'-konec, rozhraní exon 2 - 3	76	E74-like factor 1
<i>MRPL19</i> (9801)	Hs00608519_m1*	rozhraní exon 2 - 3	72	mitochondrial ribosomal protein L19

<i>PESI</i> (23481)	Hs00362795_g1*	3'-konec, rozhraní exon 13-14	56	pescadillo homolog 1
<i>RPL30</i> (6156)	Hs00265497_m1*	rozhraní exon 4 - 5	149	ribosomal protein L30
<i>RPS17</i> (6218)	Hs02386586_g1	rozhraní exon 2 - 3	88	ribosomal protein S17
<i>POP4</i> (10775)	Hs00198357_m1*	rozhraní exon 3 - 4	68	processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP subunit
<i>PSMC4</i> (5704)	Hs00197826_m1*	rozhraní exon 6 - 7	83	proteasome 26S subunit, ATPase, 4
<i>18S</i> (100008588)	Hs03928990_g1*	—	61	18S ribosomal RNA

Legenda:* Assay doporučena výrobcem (www.appliedbiosystems.com), “ délka amplikonu.

Analýza stability referenčních genů

V první řadě byla pro každý vzorek vypočtena ΔCt (Ct - Cycle treshold- cyklus kvantitativní PCR reakce, kdy fluorescence stanovovaného genu překročí daný práh) podle rovnice:

$\Delta Ct = Ct$ (vzorek) – Ct (kalibrátor). Jako kalibrátor sloužil vzorek zdravé tkáně s nejnižším průměrným Ct .

Poté byla vypočtena tzv. relativní kvantita Q , kdy $Q = E^{\Delta Ct}$. Za předpokladu, že účinnost PCR (efficiency) E je 100%, lze rovnici upravit následujícím způsobem: $Q = 2^{-\Delta Ct}$.

K vyhodnocení stability jednotlivých referenčních genů byly využity volně dostupné programy: NormFinder verze 19 z července 2009 [126] a geNorm verze 3.5 z března 2007 [127]. Do obou programů byly zadány studované referenční geny s hodnotami Q vypočtenými pro jednotlivé vzorky.

3.5.3. Relativní kvantifikace míry exprese genů ABC a SLC transportérů

Kvantitativní real-time PCR

Ke stanovení relativní kvantifikace exprese genů ABC a SLC transportérů byly použity sondy TaqMan® Gene Expression Assays (tabulka č 10 a 11). qPCR probíhalo na přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia).

Reakční směs (celkový objem 10 μ l) pro qPCR obsahovala 5 μ l 2x TaqMan Gene Expression Master mixu (Applied Biosystems), 0,5 μ l TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems), 4,5 μ l cDNA templátu. cDNA do reakční směsi byla naředěna na koncentraci 5 ng/ μ l. V každé reakci byla přítomna negativní kontrola, v níž byl cDNA templát nahrazen sterilní vodou k vyloučení možnosti kontaminace reakční směsi. PCR reakce probíhaly za následujících podmínek: 2 min. při 50°C, následovala iniciální denaturace 10 minut při 95°C, a 45 cyklů střídavé denaturace 15 sec při 95°C a annealing 60 sec při teplotě 60°C. Pouze pro stanovení míry exprese genů *ABCC3*, *ABCC8*, *ABCC9* a *ABCF2* byl annealing prodloužen na 90 sec.

Tabulka č. 10: Přehled použitých sond pro stanovované SLC geny

Gen (ID)	Assay ID	Název genu
<i>SLC28A1</i> (9154)	Hs00984403_m1	solute carrier family 28, member 1
<i>SLC28A2</i> (9153)	Hs00188407_m1	solute carrier family 28, member 2
<i>SLC28A3</i> (64078)	Hs00910439_m1	solute carrier family 28, member 3
<i>SLC29A1</i> (2030)	Hs01085706_m1	solute carrier family 29, member 1
<i>SLC29A2</i> (3177)	Hs00155426_m1	solute carrier family 29, member 2
<i>SLC29A3</i> (55315)	Hs00983219_m11	solute carrier family 29, member 3

Tabulka č. 11: Přehled použitých sond pro stanovované ABC geny

Gen (ID)	Assay ID	Název genu
<i>ABCA1</i> (19)	Hs00194045_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
<i>ABCA2</i> (20)	Hs00242232_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2
<i>ABCA3</i> (21)	Hs00184543_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3
<i>ABCA4</i> (24)	Hs00184367_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4
<i>ABCA5</i> (23461)	Hs00363322_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5
<i>ABCA6</i> (23460)	Hs00365329_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6
<i>ABCA7</i> (10347)	Hs00185303_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7
<i>ABCA8</i> (10351)	Hs00992371_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8
<i>ABCA9</i> (10350)	Hs00329320_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9
<i>ABCA10</i> (10349)	Hs00365268_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 10
<i>ABCA12</i> (26154)	Hs00292421_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12
<i>ABCA13</i> (154664)	Hs01110169_m1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13
<i>ABCB1</i> (5243)	Hs00184491_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
<i>ABCB2</i> (6890)	Hs00388677_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 2

<i>ABCB3</i> (6891)	Hs00241060_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 3
<i>ABCB4</i> (5244)	Hs00240956_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
<i>ABCB5</i> (340273)	Hs00698751_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5
<i>ABCB6</i> (10058)	Hs00180568_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6
<i>ABCB7</i> (22)	Hs00188776_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7
<i>ABCB 8</i> (11194)	Hs00185159_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8
<i>ABCB 9</i> (23457)	Hs00608640_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9
<i>ABCB10</i> (23456)	Hs00429240_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10
<i>ABCB11</i> (8647)	Hs00184824_m1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
<i>ABCC1</i> (4363)	Hs00219905_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
<i>ABCC2</i> (1244)	Hs00166123_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
<i>ABCC3</i> (8714)	Hs00358656_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
<i>ABCC4</i> (10257)	Hs00195260_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4
<i>ABCC5</i> (10057)	Hs00981089_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5
<i>ABCC6</i> (368)	Hs00184566_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6
<i>ABCC7</i> (1080)	Hs00357011_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 7
<i>ABCC8</i> (6833)	Hs00165861_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8
<i>ABCC9</i> (10060)	Hs00245832_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
<i>ABCC10</i> (89845)	Hs00375716_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10
<i>ABCC11</i> (85320)	Hs01090768_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 11
<i>ABCC12</i> (94160)	Hs00264354_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 12
<i>ABCC13</i> (94160)	Hs01051917_m1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 13
<i>ABCD1</i> (215)	Hs00163610_m1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1
<i>ABCD2</i> (225)	Hs00193054_m1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
<i>ABCD3</i> (5825)	Hs00161065_m1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3
<i>ABCD4</i> (5826)	Hs00245340_m1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 4
<i>ABCE1</i> (6059)	Hs01009190_m1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1
<i>ABCF1</i> (23)	Hs00153703_m1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1
<i>ABCF2</i> (10061)	Hs00606493_m1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2
<i>ABCF3</i> (55324)	Hs00217977_m1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3
<i>ABCG1</i> (9619)	Hs00245154_m1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
<i>ABCG2</i> (9429)	Hs00184979_m1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
<i>ABCG4</i> (64137)	Hs00223446_m1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4
<i>ABCG5</i> (64240)	Hs00223686_m1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5
<i>ABCG8</i> (64241)	Hs00223690_m1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8

Analýza míry exprese sledovaných genů

K hodnocení míry exprese sledovaných transportérů byl použit program REST 2009 (Qiagen), který v porovnání s klasickou metodou pomocí $\Delta\Delta C_t$ umožňuje srovnání míry exprese sledovaných genů vzhledem k většímu počtu referenčních genů a při hodnocení rozdílu mezi tkání nádoru a kontrolní nenádorovou tkání kalkuluje i s procentuální úspěšností PCR reakce (E).

Účinnost E byla určena programem Rotor-Gene 6 ze sklonu kalibrační křivky (slope), sestrojené pro každý sledovaný gen změřením exprese kalibrátoru (vzorku nenádorové tkáně pankreatu ZPI5) v pěti různých ředěních.

$$E=10^{-1/\text{slope}}-1$$

Do programu byly vneseny hodnoty C_t pro každý gen jak pro tkáň nádoru (samples), tak i párovou nenádorovou okolní tkáň (controls). Jako referenční geny pro karcinom pankreatu byly zvoleny geny *MRPL19*, *EIF1*, *POLR2A* viz. kapitola: 3.5.2. Výběr stabilních referenčních genů, str. 45.

Po zadání dat software vypočítal relativní exprese pomocí rovnice:

Relativní exprese = koncentrace sledovaného genu/střední geometrický průměr koncentrace všech použitých referenčních genů. Koncentrace byla vypočtena na základě rovnice:

$$\text{Koncentrace} = E^{\text{průměrné } C_t \text{ kontrol} - \text{průměrné } C_t \text{ nádorů}}$$

REST 2009 zároveň posuzuje statistickou významnost rozdílu exprese, kterou vyjadřuje 95% intervalem spolehlivosti (CI) a hodnotou významnosti p.

4. VÝSLEDKY

4.1. Charakteristika studované populace

4.1.1. Soubor pacientů s karcinomem pankreatu a zdravých kontrol

Skupina pacientů s karcinomem pankreatu se skládala z 63% z mužů a z 37% z žen, zatímco ve skupině zdravých kontrol bylo 41% žen a 59% mužů. Složení obou skupin, s ohledem na pohlaví, nebylo významně odlišné ($p=0,384$; Pearsonův chi-kvadrát test). Naopak průměrný věk pacientů s diagnózou karcinomu pankreatu byl významně vyšší oproti kontrolní skupině ($p<0,001$; studentův t-test). Kompletní charakteristiky obou skupin jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Naše analýza potvrdila jako nezávislé rizikové faktory vzniku karcinomu pankreatu vyšší věk (OR=1,42; 95% CI=1,30-1,55; $p=0,035$), mužské pohlaví (OR=2,62; 95% CI=1,61-4,24; $p<0,001$), nižší hmotnost (OR=1,05; 95% CI=1,04-1,07; $p<0,001$), pankreatitis a diabetes mellitus v osobní anamnéze (OR=10,46; 95% CI=2,85-38,45; $p<0,001$, OR=4,00; 95% CI=1,90-8,43; $p<0,001$) Významně nižší riziko vzniku karcinomu pankreatu měli pravidelní konzumenti čaje (více než 3 šálky denně; OR=0,16; 95% CI=0,07-0,40; $p<0,001$), zatímco pití alkoholu a kávy, stejně jako kouření, v našem souboru nehrálo úlohu nezávislého rizikového faktoru.

Tabulka č. 12: Charakteristiky studované populace u pacientů s karcinomem pankreatu a zdravých kontrol

	Kontroly, N (%)	Případy (%)
Pohlaví (N)		
Mužské	158 (60)	148 (63)
Ženské	107 (40)	87 (37)
Celkem	265	235
Věk (roky)		
Průměr ± SD	57,9 ± 10,6	61,9 ± 10,5
Váha (kg)		
Průměr ± SD	76,0 ± 14,5	67,5 ± 15,0
Diabetes v osobní anamnéze (N)		
Negativní	245 (94)	194 (85)
Pozitivní	17 (6)	33 (15)
Celkem	262	227
Pancreatitis v osobní anamnéze (N)		
Negativní	258 (98)	212 (93)
Pozitivní	4 (2)	15 (7)
Celkem	262	227
Kouření (N)		
Nekuřáci	106 (41)	71 (38)
Exkuřáci (> 10 let)	54 (21)	34 (18)
Exkuřáci (0-10 let)	22 (9)	25 (13)

Kuřáci	75 (29)	57 (31)
Celkem	257	187
Alkohol (N)		
Nikdy	78 (30)	68 (36)
Příležitostně	40 (16)	51 (28)
Pravidelně*	141 (54)	68 (36)
Celkem	259	187
Káva (N)		
Nikdy (nebo < 1/měsíc)	35	73
< 1/týden	4	7
1-2/týden	26	14
3-5/týden	16	18
1-2/den	135	85
3-4/den	43	22
>4/den	6	9
Celkem	265	228
Čaj (N)		
Nikdy (nebo < 1/měsíc)	68	99
< 1/týden	15	14
1-2/týden	32	28
3-5/týden	37	27
1-2/den	71	52
3-4/den	32	7
>4/den	10	1
Celkem	265	228

Legenda: * Za pravidelnou konzumaci alkoholu byla považována konzumace více jak jedné dávky alkoholu denně. Dávka v této studii byla stanovena jako 15-20 g etanolu, což odpovídá přibližně 0,5 l piva, 0,2 l vína nebo 0,05 l destilátu.

4.1.2. Soubor pacientů s kolorektálním karcinomem a zdravých kontrol

Do studie případů a kontrol bylo zařazeno 495 pacientů s kolorektálním karcinomem a 495 kontrolních jedinců. Základní charakteristiku této populace s přihlédnutím k možným zavádějícím faktorům shrnuje tabulka č. 13.

Obě skupiny se statisticky významně lišily v dosaženém vzdělání, bydlišti a v podílu kuřáků. Kontrolní skupina měla větší zastoupení středoškoláků a vysokoškoláků, a v porovnání s případy měli účastníci bydliště častěji v příměstských oblastech než na venkově. Ve skupině případů bylo statisticky významně vyšší zastoupení bývalých kuřáků, kteří přestali kouřit v době kratší než pět let před zahájením studie ($p=0,008$, chi-kvadrát test). Vzhledem k věku, byla skupina kontrol v průměru o 1,7 let mladší ($p=0,036$, ANOVA test). Biologická významnost tohoto rozdílu není pravděpodobná, protože kontroly byly kolonoskopicky ověřeny.

Tabulka č. 13: Charakteristiky studované populace u pacientů s kolorektálním karcinomem a zdravých kontrol.

	Kontroly, N (%)	Případy (%)
Pohlaví (N)		
Mužské	265 (54)	289 (58)
Ženské	230 (46)	206 (42)
Celkem	495	495
Věk (roky)		
Průměr ± SD	55,5 ± 13,8	57,2 ± 11,5
BMI		
Průměr ± SD	26,7 ± 4,5	26,6 ± 4,3
Kouření (N)		
Nekuřáci	195 (39)	243 (49)
Exkuřáci (> 5 let)	76 (16)	99 (20)
Exkuřáci (0-5 let)	17 (3)	47 (10)
Kuřáci	76 (16)	74 (15)
Neuvedeno	131 (26)	32 (6)
Celkem	495	495
Vzdělání (N)		
Základní	89 (18)	112 (23)
Středoškolské	200 (40)	174 (35)
Vysokoškolské	72 (15)	41 (8)
Neuvedeno	134 (27)	168 (34)
Bydliště (N)		
Venkov	79 (16)	98 (20)
Příměstská oblast	78 (16)	50 (10)
Centrum města	212 (43)	207 (42)
Neuvedeno	126 (25)	140 (28)

4.1.3. Soubor pacientů po chirurgické léčbě karcinomu pankreatu

Podařilo se zajistit poměrně homogenní soubor tkání pacientů s karcinomem pankreatu. Všechny desítky vzorků bylo histologicky verifikováno jako adenokarcinom pankreatu se středním až nízkým stupněm diferenciace nádorových buněk (grade 2-3). Kromě jednoho vzorku byl nádor lokalizovaný v hlavě slinivky břišní. V naprosté většině se jednalo o pokročilý stupeň maligního onemocnění (stádia III a IV). Dva vzorky (PCI12 a PCI15) by teoreticky mohly splňovat kritéria II. stádia, pokud by se podařilo prokázat nepřítomnost vzdálených metastáz.

Tabulka č. 14: Charakteristiky studované populace u pacientů po chirurgické léčbě karcinomu pankreatu

Vzorek	Pohlaví	Věk v době diagnózy	Chirurgie *	Stádium	Lymfatické uzliny #	Grade
PCI2	žena	54	hlava/R0	pT3N0M1	0/9	3
PCI4	muž	69	hlava/R0	pT3N0Mx	0/3	3
PCI5	muž	63	hlava/R0	pT3N1Mx	1/3	3
PCI7	muž	46	hlava/R0	pT3N1Mx	1/9	3
PCI8	žena	74	hlava/R0	pT3N1Mx	5/14	3
PCI9	žena	54	hlava/R1	pT2N1Mx	9/18	2
PCI10	žena	53	hlava/R0	pT4N1Mx	1/24	2
PCI12	žena	71	hlava/R0	pT2N0Mx	0/14	2
PCI15	muž	72	hlava/R0	pT2N0Mx	0/14	2
PCI17	žena	65	ocas/R0	pT3N1Mx	1/23	3

Legenda: *anatomická lokalizace nádoru/radikalita resekce; #počet lymfatických uzlin s prokázanými metastázami/počet všech vyšetřených uzlin

4.2. Polymorfismy v genech kódujících biotransformační enzymy a riziko vzniku nádorového onemocnění

4.2.1. Polymorfismy v genech kódujících biotransformační enzymy a riziko vzniku karcinomu pankreatu

Variantní alela *CYP2A13*7* (Arg101STOP), kódující inaktivní enzym byla nalezena u 7 z 265 hodnocených zdravých kontrol, ale nebyla nalezena u žádného pacienta (n=235, tabulka č. 15). V analýze podskupiny kontrol s kompletními údaji o kouření bylo zjištěno, že 2 kuřáci (n=104) a 4 nekuřáci (n=150) jsou nosiči *CYP2A13*7* variantní alely. Snížená schopnost bioaktivaace prokarcinogenů, které jsou obsaženy nejen v cigaretovém kouři jako např. NNK může tedy být potenciálním protektivním faktorem vzniku karcinomu pankreatu. Přes tento silný trend nelze vyjádřit statistickou významnost vzhledem k tomu, že tato alela nebyla u žádného pacienta s karcinomem pankreatu nalezena.

Výskyt variantní alely *GSTP1-Val* a genotypu *GSTT1-null* byl naopak spojen se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu pankreatu (OR=1,4; 95% CI=1,02-1,92 a OR=1,79; 95% CI=1,12-2,84), přičemž kombinace přítomnosti obou alel u nosiče riziko dále zvýšila (OR=2,38; 95% CI=1,17-4,83, tabulka č. 16). Tento trend byl sledován zejména u pacientů mladších 50-ti let. Oba enzymy detoxikují produkty tabákového kouře a další kontaminanty životního prostředí, např.: polycyklické aromáty. Ani zde nebyla nalezena souvislost mezi kouřením a polymorfismy a výskyt variantních alel zvyšoval riziko nezávisle na abusu alkoholu a dalších sledovaných epidemiologických faktorech.

Výskyt polymorfismů v genech kódujících alkoholdehydrogenázy: *ADH1B*, *ADH1C* se mezi pacienty a kontrolami významně nelišil, a to ani při vzájemné kombinaci (tabulka č. 17). V následné podrobné analýze nebyly nalezeny rozdíly v riziku vzniku nádorů pankreatu a funkčními polymorfismy v alkoholdehydrogenázách ani v jednotlivých podskupinách abstinentů, příležitostných konzumentů a pravidelných konzumentů alkoholu.

V ostatních sledovaných genech, *GSTM1* a *EPHX1*, stejně jako v genech kódujících enzymy metabolismu volných radikálů: *SOD2*, *SOD3*, *NQO1* a *NQO2* nebyly nalezeny žádné statisticky významné vztahy pro analyzované funkční polymorfismy u pacientů a kontrol, a to ani s přihlédnutím k dalším modifikujícím rizikovým faktorům životního stylu (tabulky č. 18-21).

Tabulka č. 15: Polymorfismus CYP2A13 ve sledované populaci

Genotyp	Kontroly (%)	Případy (%)	OR [†]	95% CI [†]	p [†]
<i>CYP2A13</i> , rs72552266					
<i>Arg/Arg</i>	258 (97,4)	235 (100,0)	reference	-	-
<i>Arg/STOP</i>	7 (2,6)	0 (0,0)	*	*	*
<i>STOP/STOP</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	*	*	*
Celkem	265	235			

Legenda: *nelze statisticky zpracovat vzhledem k absenci nosičů variantní alely v jedné nebo obou sledovaných skupinách.

† OR, odds ratio - odhad relativního rizika s přihlédnutím k věku, pohlaví a kouření; CI, 95% interval spolehlivosti p, statistická významnost.

Tabulka č. 16: Polymorfismy glutathion S-transferáz a vztah k věku studovaných objektů

Genotyp	Případy (%)	Kontroly (%)	Bez rozdílu věku OR [†] (95% CI [†])	< 50 let OR [†] (95% CI [†])	≥ 50 let OR [†] (95% CI [†])
GSTM1					
<i>Plus</i>	115 (45,5)	188 (46,7)	reference	reference	reference
<i>Null</i>	138 (54,6)	215 (53,4)	0,92 (0,64–1,31)	0,85 (0,39–1,89)	0,90 (0,59–1,36)
Celkem	253	403			
GSTT1					
<i>Plus</i>	199 (81,9)	308 (88,8)	reference	reference	reference
<i>Null</i>	45 (18,1)	39 (11,2)	1,56 (0,93–2,61)	1,13 (0,33–3,93)	1,66 (0,91–3,04)
Celkem	244	347			
GSTP1					
<i>Ile/Ile</i>	100 (39,5)	192 (47,8)	reference	reference	reference
<i>Ile/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	153 (60,5)	210 (52,2)	1,38 (0,96–1,97)	3,09 (1,25–7,63)	1,23 (0,81–1,87)
Celkem	253	402			
Kombinace GSTT1 a GSTP1					
<i>Plus-Ile/Ile</i>	76 (31,3)	146 (42,1)	reference	reference	reference
<i>Null-Ile/Ile</i>	18 (7,4)	21 (6,0)	1,46 (0,97–2,18)	0,77 (0,10–5,67)	1,69 (0,69–4,13)
<i>Plus-Ile/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	123 (50,6)	162 (46,7)	1,46 (0,69–3,12)	3,00 (1,15–7,82)	1,31 (0,81–2,09)
<i>Plus-Ile/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	26 (10,7)	18 (5,2)	2,50 (1,20–5,20)	4,40 (0,79–24,7)	2,21 (0,95–5,15)
Celkem	243	347			

Legenda: † OR, odds ratio- odhad relativního rizika s přihlédnutím k věku, pohlaví a kouření; CI, 95% konfidenční interval.

Tabulka č. 17: Polymorfismy *ADH1B* a *ADH1C* ve sledované populaci

Genotyp	Kontroly (%)	Případy (%)	OR [†]	95% CI [†]	p [†]
<i>ADH1B</i>,rs1229984					
<i>Arg/Arg</i>	242	213	reference		
<i>Arg/His</i>	22	22	1,25	0,56-2,77	0,583
<i>His/His</i>	1	0	*		
<i>Arg/His</i> nebo <i>His/His</i>	23	22	1,16	0,53-2,55	0,706
Celkem	265	235			
<i>ADH1C</i>,rs698					
<i>Ile/Ile</i>	80	83			
<i>Ile/Val</i>	138	109	0,93	0,56-1,53	0,766
<i>Val/Val</i>	46	43	1,65	0,87-3,13	0,123
<i>Ile/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	184	152	1,09	0,68-1,74	0,730
Celkem	264	235			
Kombinace <i>ADH1B</i> a <i>ADH1C I</i>					
<i>Arg/Arg</i> a <i>Ile/Ile</i>	70	71	reference		
(<i>Arg/His</i> nebo <i>Arg/Arg</i>) nebo (<i>Ile/Val</i> nebo <i>Ile/Ile</i>)	196	164	1,16	0,70-1,90	0,566
Kombinace <i>ADH1B</i> a <i>ADH1C II</i>					
<i>Arg/Arg</i> a <i>Ile/Ile</i>	70	71	reference		
(<i>Arg/His</i> nebo <i>Arg/Arg</i>) a (<i>Ile/Val</i> nebo <i>Ile/Ile</i>)	11	10	1,09	0,31-3,85	0,888

Legenda: † OR, odds ratio- odhad relativního rizika s přihlédnutím k věku, pohlaví, váze, diabetu, pankreatitidě a konzumaci alkoholu, kávy, čaje; CI, 95% interval spolehlivosti; p, statistická významnost.

*nelze statisticky zpracovat vzhledem k absenci nosičů variantní alely ve skupině pacientů.

Tabulka č. 18: Polymorfismy genů kódujících enzymy metabolismu volných radikálů: *SOD2*, *SOD3*, *NQO1*, a *NQO2* ve sledované populaci

Genotyp	Kontroly (%)	Případy (%)	OR [†]	95% CI [†]	p [†]
<i>SOD2</i>,rs4880					
<i>Ala/Ala</i>	58 (21,9)	48 (20,4)	reference	-	-
<i>Ala/Val</i>	134 (50,6)	121 (51,5)	1,24	0,72 – 2,12	0,440
<i>Val/Val</i>	73 (27,5)	66 (28,1)	1,04	0,57 – 1,90	0,896
<i>Ala/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	207	187	1,16	0,70 – 1,93	0,560
Celkem	265	235			
<i>SOD3</i>,rs1799895					
<i>Arg/Arg</i>	264 (99,6)	229 (97,4)	reference	-	-
<i>Arg/Gly</i>	1 (0,4)	6 (2,6)	4,41	0,42 – 46,05	0,215
<i>Gly/Gly</i>	0	0			

Celkem	265	235			
NQO1,rs1800566					
<i>Pro/Pro</i>	187 (70,6)	164 (69,8)	reference	-	-
<i>Pro/Ser</i>	71 (26,8)	64 (27,2)	1,12	0,69 – 1,81	0,642
<i>Ser/Ser</i>	7 (2,6)	7 (3,0)	1,70	0,47 – 6,19	0,418
<i>Pro/Ser</i> nebo <i>Ser/Ser</i>	78	71	1,16	0,73 – 1,85	0,523
Celkem	265	235			
NQO2,rs1143684					
<i>Phe/Phe</i>	153 (57,7)	146 (62,1)	reference	-	-
<i>Phe/Leu</i>	104 (39,3)	78 (33,2)	0,82	0,53 – 1,27	0,375
<i>Leu/Leu</i>	8 (3,0)	11 (4,7)	1,23	0,37 – 4,06	0,734
<i>Phe/Leu</i> nebo <i>Leu/Leu</i>	112	89	0,85	0,55 – 1,30	0,447
Celkem	265	235			

Legenda: † OR, odds ratio - odhad relativního rizika s přihlédnutím k věku, pohlaví, váze, diabetu, pankreatitidě a konzumaci alkoholu, kávy, čaje a kouření; CI, 95% interval spolehlivosti; p, statistická významnost.

Tabulka č. 19: Polymorfismy v podskupině nekuřáků

Genotyp	Kontroly (%)	Případy (%)	OR[†]	95% CI[†]	p[†]
SOD2,rs4880					
<i>Ala/Ala</i>	21 (19,6)	17 (24,0)	reference	-	-
<i>Ala/Val</i>	55 (51,4)	33 (46,4)	1,17	0,48 – 2,87	0,733
<i>Val/Val</i>	31 (29,0)	21 (29,6)	1,19	0,44 – 3,19	0,729
<i>Ala/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	86	54	1,18	0,50 – 2,75	0,707
Celkem	107	71			
SOD3,rs1799895					
<i>Arg/Arg</i>	106 (99,1)	69 (97,2)	reference	-	-
<i>Arg/Gly</i>	1 (0,9)	2 (2,8)	4,62	0,26 – 82,24	0,297
<i>Gly/Gly</i>	0	0			
Celkem	107	71			
NQO1,rs1800566					
<i>Pro/Pro</i>	75 (70,1)	50 (70,4)	reference	-	-
<i>Pro/Ser</i>	30 (28,0)	17 (24,0)	0,94	0,41 – 2,15	0,883
<i>Ser/Ser</i>	2 (1,9)	4 (5,6)	9,30	1,20 – 71,87	0,033
<i>Pro/Ser</i> nebo <i>Ser/Ser</i>	32	21	1,23	0,56 – 2,68	0,605
Celkem	107	71			
NQO2,rs1143684					
<i>Phe/Phe</i>	60 (56,1)	36 (50,7)	reference	-	-
<i>Phe/Leu</i>	44 (41,1)	33 (46,5)	1,18	0,59 – 2,36	0,638
<i>Leu/Leu</i>	3 (2,8)	2 (2,8)	1,29	0,15 – 10,82	0,811
<i>Phe/Leu</i> nebo <i>Leu/Leu</i>	47	35	1,19	0,60 – 2,34	0,447
Celkem	107	71			

Legenda: † OR, odds ratio - odhad relativního rizika s přihlédnutím k věku, pohlaví, váze, diabetu, pankreatitidě a konzumaci alkoholu, kávy, čaje; CI, 95% interval spolehlivosti; p, statistická významnost.

Tabulka č. 20: Polymorfismy v podskupině kuřáků

Genotyp	Kontroly (%)	Případy (%)	OR [†]	95% CI [†]	p [†]
SOD2,rs4880					
<i>Ala/Ala</i>	36 (23,7)	24 (20,7)	reference	-	-
<i>Ala/Val</i>	75 (49,3)	63 (54,3)	1,27	0,63 – 2,58	0,506
<i>Val/Val</i>	41 (27,0)	29 (25,0)	0,83	0,37 – 1,87	0,649
<i>Ala/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	116	92	1,10	0,56 – 2,16	0,775
Celkem	152	116			
SOD3,rs1799895					
<i>Arg/Arg</i>	152 (100,0)	113 (97,4)	reference	-	-
<i>Arg/Gly</i>	0 (0,0)	3 (2,6)	-	-	-
<i>Gly/Gly</i>	0	0			
Celkem	152	116			
NQO1,rs1800566					
<i>Pro/Pro</i>	107 (70,4)	77 (66,4)	reference	-	-
<i>Pro/Ser</i>	40 (26,3)	37 (31,9)	1,26	0,67 – 2,38	0,476
<i>Ser/Ser</i>	5 (3,3)	2 (1,7)	0,15	0,01 – 1,56	0,111
<i>Pro/Ser</i> nebo <i>Ser/Ser</i>	45	39	1,10	0,59 – 2,04	0,768
Celkem	152	116			
NQO2,rs1143684					
<i>Phe/Phe</i>	89 (58,5)	81 (69,8)	reference	-	-
<i>Phe/Leu</i>	58 (38,2)	29 (25,0)	0,53	0,28 – 0,98	0,044
<i>Leu/Leu</i>	5 (3,3)	6 (5,2)	0,86	0,20 – 3,67	0,844
<i>Phe/Leu</i> nebo <i>Leu/Leu</i>	63	35	0,56	0,31 – 1,01	0,055
Celkem	152	116			

Legenda: † OR, odds ratio - odhad relativního rizika s přihlédnutím k věku, pohlaví, váze, diabetu, pankreatitidě a konzumaci alkoholu, kávy, čaje; CI, 95% interval spolehlivosti; p, statistická významnost.

Tabulka č. 21: Polymorfismy v podskupině pravidelných konzumentů alkoholu

Genotyp	OR [†]	95% CI [†]	p [†]
SOD2 <i>Ala/Val</i>	1,64	0,70 – 3,82	0,254
SOD2 <i>Val/Val</i>	0,78	0,29 – 2,08	0,615
SOD2 <i>Ala/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	1,27	0,57 – 2,84	0,553
NQO1 <i>Pro/Ser</i>	1,38	0,66 – 2,90	0,399
NQO1 <i>Ser/Ser</i>	4,90	0,77 – 30,96	0,091
NQO1 <i>Pro/Ser</i> nebo <i>Ser/Ser</i>	1,58	0,78 – 3,22	0,207
NQO2 <i>Phe/Leu</i>	0,63	0,31 – 1,27	0,195
NQO2 <i>Leu/Leu</i>	1,73	0,19 – 15,98	0,627
NQO2 <i>Phe/Leu</i> nebo <i>Leu/Leu</i>	0,67	0,34 – 1,33	0,252

Legenda: † OR, odds ratio- odhad relativního rizika s přihlédnutím k věku, pohlaví, váze, diabetu, pankreatitidě, konzumaci kávy, čaje a kouření; CI, 95% interval spolehlivosti; p, statistická významnost .

4.2.2. Polymorfismy v genech kódující biotransformační enzymy a riziko vzniku kolorektálního karcinomu

Souhrn adjustovaných a hrubých odhadů relativního rizika (adjusted odds ratios - aOR a crude odds ratios - cOR), 95% intervaly spolehlivosti (95% CI) a odpovídající statistické významnosti (p-values) jsou shrnuty v tabulkách č. 22 a 23.

Delece v genu *GSTM1* mírně zvýšila riziko vzniku karcinomu kolorekta (cOR=1,23; 95% CI=0,96-1,58; p=0,098). Po zohlednění ostatních rizikových faktorů ve výpočtu rizika (věku, pohlaví, kouření a bydliště) dosáhl tento vztah statistické významnosti (aOR=1,30; 95% CI=1,01-1,68; p=0,044).

Ani genetické polymorfismy v genech *EPHX1*, *NQO1*, *GSTP1*, a *GSTT1*, ani aktivita EPHX1, odvozená kombinací obou sledovaných polymorfismů, neovlivňovaly riziko vzniku kolorektálního karcinomu.

Podobně jako v předchozích studiích na jiných souborech pacientů [128], byl i pro kolorektální karcinom spočítán efekt kombinace funkčně významných polymorfismů v glutathion S-transferázách a epoxid hydroláze. Bez přihlídnutí k ostatním faktorům žádná z analyzovaných kombinací (*GSTM1-GSTT1*, *GSTM1-GSTP1*, *GSTT1-GSTP1*, *GSTM1-EPHX1*-aktivita, *GSTT1-EPHX1*-aktivita, a *GSTP1-EPHX1*-aktivita) neovlivňovala riziko vzniku kolorektálního karcinomu (tabulka č. 23). Adjustovaná analýza zohledňující věk, pohlaví, kouření a bydliště však ukázala, že nosiči kombinace delecí v genech *GSTM1* a *GSTT1* (*GSTM1*-null a *GSTT1*-null) mají mírně vyšší riziko vzniku nádorů tlustého střeva ve srovnání s jedinci bez delecí v těchto dvou genech (aOR=1,58; 95% CI=1,01-2,47; p=0,044).

Vztah k riziku kolorektálního karcinomu mezi nosiči jednotlivých funkčních polymorfismů v podskupině kuřáků a nekuřáků, podobně jako u karcinomu pankreatu, nebyl prokázán.

Tabulka č. 22: Polymorfismy sledovaných genů u kolorektálního karcinomu

Genotyp	Případy (%)	Kontroly (%)	cOR [†] (95% CI [†])	aOR [†] (95% CI [†])	p [†]
<i>GSTM1</i>					
<i>Plus</i>	228 (46,1)	254 (51,3)	reference	reference	
<i>Null</i>	267 (53,9)	241 (48,7)	1,23 (0,96 - 1,58)	1,30 (1,01 - 1,68)	0,044
Celkem	495	495			
<i>GSTT1</i>					
<i>Plus</i>	392 (79,2)	395 (79,8)	reference	reference	
<i>Null</i>	103 (20,8)	100 (20,2)	1,04 (0,76 - 1,41)	1,07 (0,78 - 1,47)	0,664
Celkem	495	495			

GSTP1, rs1695					
<i>Ile/Ile</i>	223 (45,1)	224 (45,3)	reference	reference	
<i>Ile/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	272 (54,9)	271 (54,7)	1,01 (0,79 - 1,30)	1,01 (0,78 - 1,30)	0,942
Celkem	495	495			
EPHX1, rs1051740					
<i>Tyr/Tyr</i>	221 (44,6)	231 (46,7)	reference	reference	
<i>Tyr/His</i> nebo <i>His/His</i>	274 (55,4)	264 (53,3)	1,09 (0,85 - 1,39)	1,06 (0,82 - 1,37)	0,635
Celkem	495	495			
EPHX1, rs2234922					
<i>His/His</i>	297 (60,0)	290 (58,6)	reference	reference	
<i>His/Arg</i> nebo <i>Arg/Arg</i>	198 (40,0)	205 (41,4)	0,94 (0,73 - 1,22)	0,91 (0,70 - 1,18)	0,482
Celkem	495	495			
NQO1, rs1800566					
<i>Pro/Pro</i>	346 (69,9)	344 (69,5)	reference	reference	
<i>Pro/Ser</i> nebo <i>Ser/Ser</i>	149 (30,1)	151 (30,5)	0,98 (0,75 - 1,29)	1,03 (0,78 - 1,35)	0,853
Celkem	495	495			

Legenda: † cOR (crude odds ratio) – hrubý odhad relativního rizika; aOR (adjusted odds ratio) - odhad relativního rizika s přihlédnutím k věku, pohlaví, kouření a bydlišti, CI – 95% interval spolehlivosti; p - statistická významnost.

Tabulka č. 23: Kombinace polymorfismů v *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* a *EPHX1* vzhledem k riziku vzniku nádorů kolorekta

Genotyp	Případy	Kontroly	cOR [†] (95%CI [†])	aOR [†] (95% CI [†])	p [†]
<i>GSTM1-plus</i> a <i>GSTT1-plus</i>	186	200	reference	reference	
<i>GSTM1-null</i> a <i>GSTT1-null</i>	61	46	1,43 (0,93 - 2,20)	1,58 (1,01 - 2,47)	0,044
<i>GSTM1-plus</i> a <i>GSTP1-Ile/Ile</i>	148	116	reference	reference	
<i>GSTM1-null</i> a <i>GSTP1-Ile/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	104	133	1,24 (0,87 - 1,77)	1,26 (0,87 - 1,80)	0,220
<i>GSTT1-plus</i> a <i>GSTP1-Ile/Ile</i>	174	178	reference	reference	
<i>GSTT1-null</i> a <i>GSTP1-Ile/Val</i> nebo <i>Val/Val</i>	54	54	1,02 (0,67 - 1,57)	1,09 (0,70 - 1,71)	0,694
<i>GSTM1-plus</i> a <i>EPHX1-</i> vysoká nebo střední	147	168	reference	reference	
<i>GSTM1-null</i> a <i>EPHX1-</i> nízká	96	84	1,31 (0,91 - 1,89)	1,36 (0,93 - 1,97)	0,111
<i>GSTT1-plus</i> a <i>EPHX1-</i> vysoká nebo střední	260	263	reference	reference	
<i>GSTT1-null</i> a <i>EPHX1-</i> nízká	38	45	1,20 (1,75 - 1,91)	1,27 (0,79 - 2,05)	0,330
<i>GSTP1-Ile/Ile</i> a <i>EPHX1-</i> vysoká nebo střední	142	146	reference	reference	
<i>GSTP1-Ile/Val</i> nebo <i>Val/Val</i> a <i>EPHX1-</i> nízká	96	92	1,07 (0,74 - 1,55)	1,07 (0,73 - 1,56)	0,727

Legenda: † cOR (crude odds ratio) - hrubý odhad relativního rizika; aOR (adjusted odds ratio) - odhad relativního rizika s přihlédnutím k věku, pohlaví, kouření a bydlišti; 95% CI – 95% interval spolehlivosti; p - statistická významnost.

4.3. Úloha alterací genu *CHEK2* v etiologii karcinomu kolorekta a pankreatu

Statistická analýza ukázala významně vyšší riziko vzniku kolorektálního karcinomu u nosičů alterací v oblasti FHA domény *CHEK2* (6,2% případů vs. 2,8% kontrol; OR=2,3; 95% CI=1,3–4,0; p=0,003), a nejčastější alterace c.470T>C (I157T), která se nachází v třetím exonu genu *CHEK2* (4,8% případů vs. 2,5% kontrol; OR=2,0; 95% CI=1,1–3,6; p=0,03) [125]. Rovněž riziko vzniku karcinomu pankreatu bylo vyšší u jedinců s přítomnou alterací v oblasti FHA domény (1,5% případů vs. 0,3% kontrol; OR=5,14; 95% CI=0,94-28,23), avšak tento vztah byl na hranici statistické významnosti (p=0,057).

Delece 5395bp nebyla nalezena ani v souboru pacientů s kolorektálním karcinomem (n=631); [125]) ani s karcinomem pankreatu (n=270) a zůstává tak v naší populaci významnou zatím pouze pro karcinom prsu [124].

Klinicko-patologické charakteristiky (věk v době diagnózy, lokalizace tumoru, stádium onemocnění, frekvence výskytu nádorových onemocnění v rodinné anamnéze apod.) se ve skupině pacientů s alteracemi *CHEK2* nelišily od skupiny pacientů bez přítomnosti genetické alterace. Výjimkou byl grading tumoru u kolorektálního karcinomu, který byl významně vyšší u pacientů s nalezenými alteracemi (p= 0.049) [125].

Tabulka č. 24: Identifikované alterace oblasti FHA domény genu *CHEK2*

Lokalizace alterace	Genetická alterace	Případy s kolorektálním karcinomem	Případy s karcinomem pankreatu	Kontroly
Exon 2	c.434G>A	1	0	0
Exon 3	c.470T>C	30 (4,8%)	6 (2,2%)	17 (2,5%)
Exon 3	c.538C>T	0	0	1
Exon 3	c.541C>T	2	0	0
Intron 1	IVS1-5T>A	1	1	0
Intron 2	IVS2+1G>A	2	1	0
Intron 2	IVS2+24C>T	3	1	1
Intron 2	IVS2+65C>T	0	1	0
Intron 2	IVS2-55C>T	1	0	0

4.4. Identifikace referenčních genů pro studium tkání karcinomu pankreatu

4.4.1. Stanovení kvality a množství RNA

Celková RNA byla vyizolována z vyoperovaných nádorů slinivky břišní s přílehlou nepostiženou tkání od 10 pacientů s diagnózou karcinomu pankreatu. Naměřené koncentrace celkové RNA získané z tkání se pohybovaly v rozmezí 0,25-5,51 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Medián RIN byl $6,45 \pm 1,00$ pro nádorovou tkáň a $3,25 \pm 1,61$ pro pankreas bez přítomnosti nádorových buněk (tabulka č 25). Z 2 μg celkové RNA, byla reverzní transkripcí připravena cDNA. Výsledná cDNA byla ověřena z hlediska přítomnosti kontaminace genomovou DNA pomocí PCR fragmentu ubiquitinu C a pouze vzorky bez kontaminace byly dále zpracovány.

Tabulka č. 25: RNA integrita jednotlivých vzorků

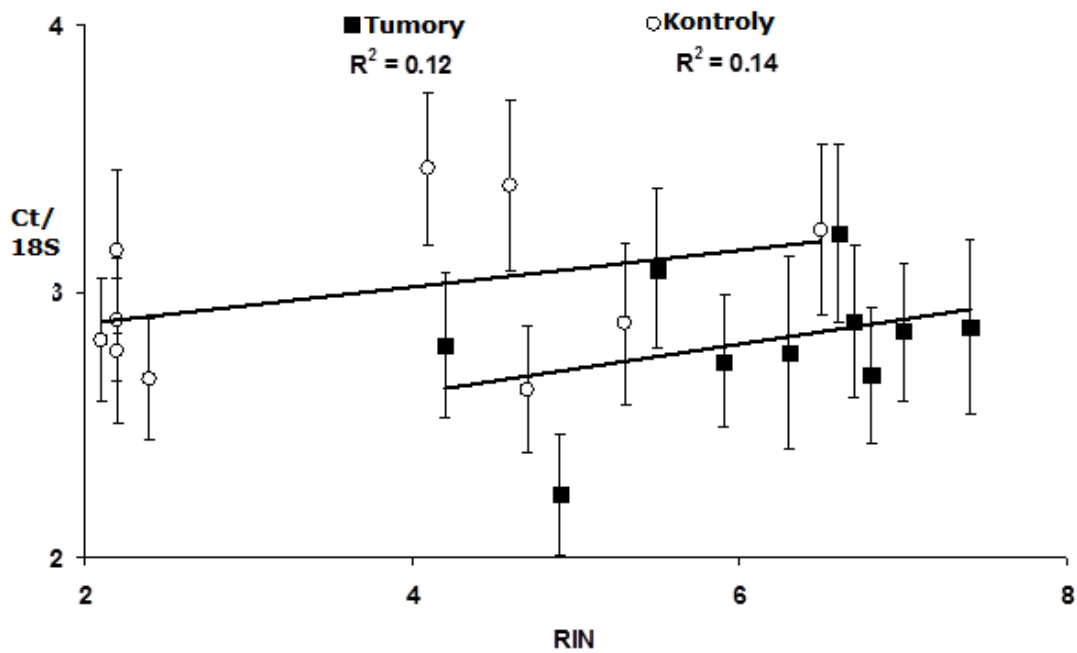
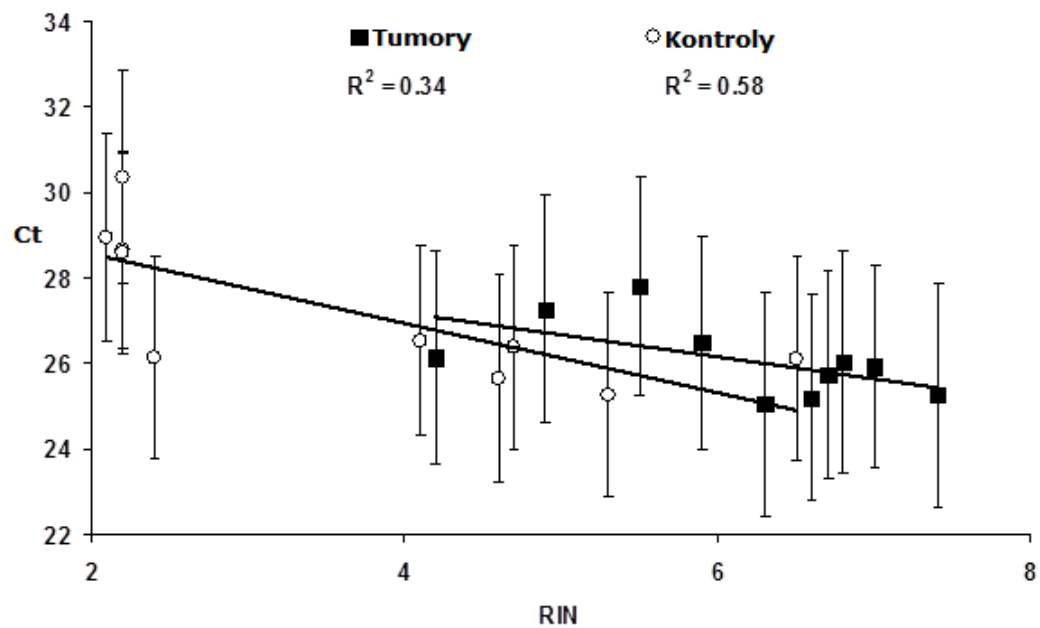
Vzorky nádorové tkáně	RIN	Vzorky nenádorové tkáně	RIN
PCI2	7,00	ZPI2	4,70
PCI4	5,50	ZPI4	2,40
PCI5	5,90	ZPI5	5,30
PCI7	6,70	ZPI7	2,10
PCI8	4,20	ZPI8	2,20
PCI9	6,80	ZPI9	6,50
PCI10	6,30	ZPI10	2,20
PCI12	4,90	ZPI12	2,20
PCI15	6,60	ZPI15	4,10
PCI17	7,40	ZPI17	4,60
Medián	6,45		3,25
S.D.	1,00		1,61

Legenda: RIN- RNA integrity number.

4.4.2. Výběr vhodných kandidátních referenčních genů

Ve všech dostupných párech nádorů a kontrolních tkání pankreatu (n=10) byly studovány hladiny transkriptů 24 endogenních kontrol vybraných z nabídky výrobce (Applied Biosystems). Průměrné hrubé hodnoty Ct pro všechny geny kromě genu 18S byly $27,06 \pm 3,47$ pro tkáň nádorovou a $27,27 \pm 2,88$ pro nenádorovou tkáň pankreatu. Průměrné Ct pro jednotlivé geny jsou vidět na obrázku č. 15 a 16. Medián hrubých hodnot Ct byl pro nádorovou a okolní tkáň 27,02 a 27,24. Hrubé počty cyklů PCR potřebných k amplifikaci daného množství úseků jednotlivých genů byly závislé na stupni degradace RNA u jednotlivých vzorků hodnoceném pomocí RIN. Statisticky významná závislost mezi RIN a průměrným Ct pro všechny sledované geny byla zjištěna ve vzorcích kontrolních tkání (Obrázek č. 15-16). Naopak, u nádorových vzorků takto významná korelace sledována nebyla. Po normalizaci dat pomocí podílu Ct(referenčního genu)/Ct(18S kontrolního genu) již tato korelace nebyla statisticky významná ani v kontrolách ani v nádorech ($p < 0,05$; obr.č. 16).

Obrázek č. 15 a 16: Průměrné Ct pro nádorovou a nenádorovou tkáň pro jednotlivé geny



Legenda: osa x- RIN jednotlivých vzorků, osa y- pro obr. 15- průměrné Ct všech stanovovaných genů pro vzorek, osa y- pro obr. 16- průměrné Ct stanovovaných genů/18S Ct.

4.4.3. Identifikace referenčních genů

Analýza stability referenčních genů pomocí programů geNorm a NormFinder byla vypočtena na základě relativní kvantity Q definované v kapitole 3.5.2. na str. 45. Jako kalibrátor byl zvolen vzorek nenádorové pankreatické tkáně ZPI5 s průměrným $C_t = 25,27 \pm 2,44$ a $RIN = 5,3$. Oba programy stanovily srovnatelné výsledky (tabulka č. 26), co se týká stability námi studovaných referenčních genů. Mezi pěti nejstabilnějšími geny byly identifikovány: *EIF2B1*, *ELF1*, *MRPL19* a *POP4*. Stejně tak oba programy vyhodnotily, že pro qPCR v rámci sledování rozdílů mezi nádorovými a nenádorovými tkáněmi pankreatu je dostačující kombinace 2-3 referenčních genů. Pro čtyři nejvhodnější geny byla dále stanovena účinnost qPCR (E) několikanásobným ředěním kalibrátoru (ZPI5). Další analýzou kalibrační křivky vzorku ZPI5 pro geny: *EIF2B1*, *ELF1*, *MRPL19* a *POP4* byla zhodnocena nejen E, ale také korelace R^2 , sklon kalibrační křivky a C_t kontroly bez templátu (NTC). Všechny vybrané geny splnily potřebné parametry pro použití jako referenční kontroly qPCR karcinomu pankreatu (tabulka č 27).

Tabulka č 26: Nejvíce a nejméně stabilní referenční geny vyhodnocené pomocí programů geNorm a NormFinder

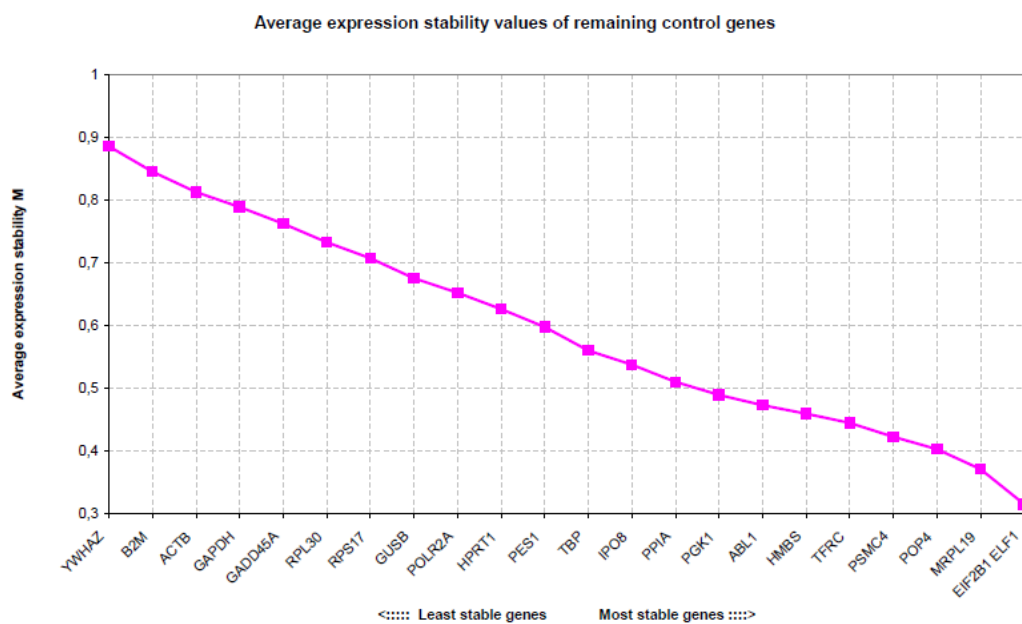
Program	Nejlépe hodnocené kandidátní geny	Nejhůře hodnoceny kandidátní geny
geNorm	<i>ELF1</i> , <i>EIF2B1</i> , <i>MRPL19</i> , <i>POP4</i> , <i>PSMC4</i>	<i>YWHAZ</i> , <i>B2M</i> , <i>ACTB</i> , <i>GAPDH</i> , <i>GADD45</i>
NormFinder	<i>POP4</i> , <i>ELF1</i> , <i>ABL1</i> , <i>EIF2B1</i> , <i>MRPL19</i> (<i>TFRC</i>)	<i>RPS17</i> , <i>GAPDH</i> , <i>ACTB</i> , <i>B2M</i> , <i>YWHAZ</i>

Tabulka č 27: Souhrn hodnocených parametrů pro čtyři nejstabilnější referenční geny

Vzorek ZPI5	<i>EIF2B1</i>	<i>MRPL19</i>	<i>ELF1</i>	<i>POP4</i>
Průměrné C_q pro NTC	>40	>40	>40	>40
Průměrné C_q pro STD1	22,02 ± 0,03	24,51 ± 0,01	19,59 ± 0,01	23,29 ± 0,02
Průměrné C_q pro STD2	23,24 ± 0,03	25,78 ± 0,04	20,59 ± 0,02	24,53 ± 0,02
Průměrné C_q pro STD3	24,52 ± 0,07	27,13 ± 0,04	21,75 ± 0,02	26,11 ± 0,01
Průměrné C_q pro STD4	26,81 ± 0,04	29,48 ± 0,12	24,14 ± 0,07	28,28 ± 0,04
Průměrné C_q pro STD5	29,24 ± 0,04	31,93 ± 0,14	26,68 ± 0,05	30,62 ± 0,08
Účinnost E	98%	94%	98%	96%
Sklon kalibrační křivky	-3,38	-3,48	-3,37	-3,43
R^2	0,999	0,999	0,999	0,998

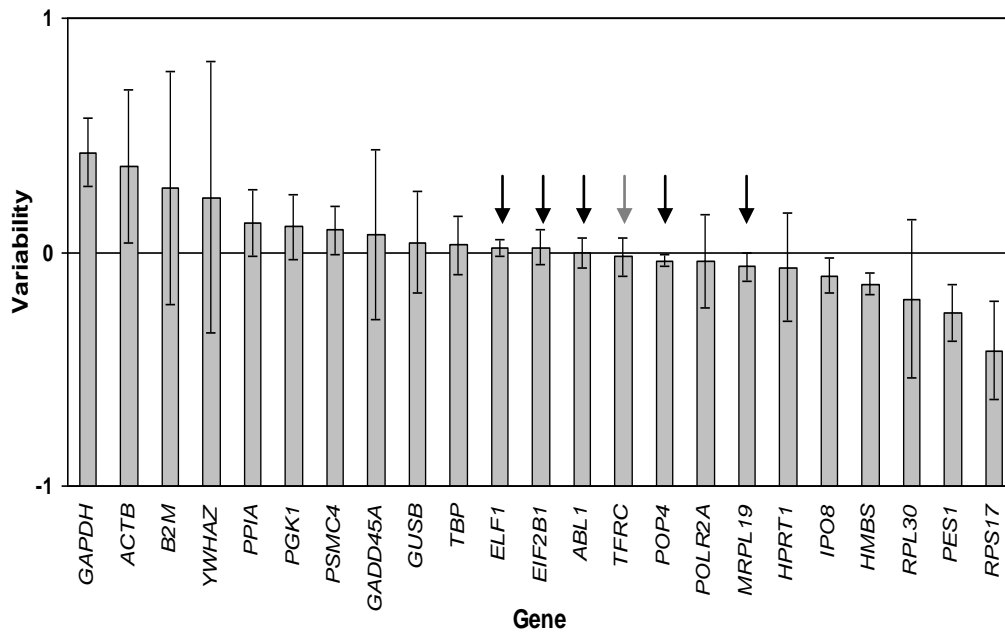
Legenda: pro sestavení kalibračních křivek byla použita cDNA vzorku ZPI5v ředění 5-krát (standard 1, STD1), 10-krát (STD2), 25-krát (STD3), 125-krát (STD4) and 625-krát (STD5). NTC (non-template kontrol, kontrola bez templátu) byla použita voda místo cDNA.

Obrázek č. 17: Výstup z programu geNorm



Legenda: Relativní kvantitativní hodnoty pro hodnocené geny byly zadány do programu geNorm. Obrázek zachycuje vyhodnocení stability. Geny s nejnižší průměrnou expresí stability, vyjádřené jako hodnota M, jsou hodnoceny jako nejstabilnější referenční geny a mohou sloužit jako vhodné endogenní kontroly pro další studie na souboru těchto vzorků. Geny, které se nacházejí na ose x nejvíce vpravo byly označeny jako nejstabilnější referenční geny.

Obrázek č. 18: Výstup z programu NormFinder



Legenda: Relativní kvantitativní hodnoty pro hodnocené geny byly zadány do programu NormFinder. Obrázek zachycuje jak variabilitu mezi nádorovou a nenádorovou (inter-group variability), tak i variabilitu v rámci jedné skupiny (intra-group variability) mezi jednotlivými testovanými vzorky. Kandidátní geny s nejnižší variabilitou mezi expresí v nádorové a nenádorové tkáni (hodnoty co nejbližší k nule) a zároveň i s co nejnižší variabilitou mezi jednotlivými vzorky stejné tkáně (chybové úsečky) byly označeny jako nejvhodnější referenční geny. Tyto geny jsou na obrázku zvýrazněny šipkami.

4.5. Relativní kvantifikace míry exprese genů ABC a SLC transportérů

U deseti vzorků nádoru pankreatu byla provedena pilotní studie genové exprese všech 49 členů lidské nadrodiny ABC transportérů. Bylo provedeno srovnání hladin v nádorové tkáni s okolní nenádorovou tkání pankreatu. Jedenáct genů mělo statisticky významně ($p < 0,05$) vyšší hladinu transkriptu (upregulace) v nádoru a čtyři geny nižší hladinu (downregulace) v tkáni adenokarcinomu (tabulka č. 28). Dvanáct genů nelze hodnotit pro obecně nízkou expresi, a to jak v tkáni nádorem nepostižené slinivky, tak i v tkáni nádorové. Ostatní geny byly exprimovány podobně v obou typech tkání.

Tabulka č. 28: Hodnocení rozdílů hladin transkriptů ABC transportérů mezi nádorovou a kontrolní tkání pomocí softwaru REST 2009

Gen	Poměr hladiny nádor/kontrola	95% CI	P (H1)	Hladina v nádoru
<i>ABCA1</i>	1,94	0,25-19,85	0,100	Beze změny
<i>ABCA2</i>	1,12	0,35-2,83	0,559	Beze změny
<i>ABCA3</i>	0,39	0,07-1,56	0,003	Snížená
<i>ABCA4</i>	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
<i>ABCA5</i>	0,37	0,04-3,03	0,007	Snížená
<i>ABCA6</i>	1,13	0,17-4,81	0,680	Beze změny
<i>ABCA7</i>	1,17	0,15-6,80	0,644	Beze změny
<i>ABCA8</i>	0,92	0,10-9,09	0,837	Beze změny
<i>ABCA9</i>	1,95	0,07-54,61	0,257	Beze změny
<i>ABCA10</i>	1,58	0,11-31,40	0,351	Beze změny
<i>ABCA12</i>	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
<i>ABCA13</i>	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
<i>ABCB1</i>	1,35	0,22-8,88	0,361	Beze změny
<i>ABCB2</i>	2,19	1,04-4,05	0,000	Zvýšená
<i>ABCB3</i>	2,19	0,89-5,83	0,000	Zvýšená
<i>ABCB4</i>	5,26	0,77-72,84	0,001	Zvýšená
<i>ABCB5</i>	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
<i>ABCB6</i>	1,29	0,79-2,51	0,023	Zvýšená
<i>ABCB7</i>	1,06	0,55-2,79	0,654	Beze změny
<i>ABCB8</i>	1,51	0,76-3,19	0,009	Zvýšená
<i>ABCB9</i>	1,73	0,33-14,10	0,127	Beze změny
<i>ABCB10</i>	1,68	0,32-16,13	0,158	Beze změny
<i>ABCB11</i>	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
<i>ABCC1</i>	1,63	0,83-3,23	0,000	Zvýšená
<i>ABCC2</i>	1,00	0,35-2,98	0,986	Beze změny
<i>ABCC3</i>	1,92	0,81-4,03	0,002	Zvýšená
<i>ABCC4</i>	1,18	0,48-2,47	0,293	Beze změny

ABCC5	2,25	0,60-8,83	0,001	Zvýšená
ABCC6	0,30	0,07-1,02	0,000	Snížená
ABCC7	0,20	0,002-5,09	0,016	Snížená
ABCC8	0,54	0,11-3,89	0,078	Beze změny
ABCC9	1,24	0,29-5,39	0,404	Beze změny
ABCC10	1,58	0,66-3,47	0,005	Zvýšená
ABCC11	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
ABCC12	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
ABCC13	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
ABCD1	1,53	0,15-17,87	0,339	Beze změny
ABCD2	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
ABCD3	1,12	0,20-20,24	0,684	Beze změny
ABCD4	1,74	0,26-17,37	0,132	Beze změny
ABCE1	1,25	0,23-15,69	0,558	Beze změny
ABCF1	1,30	0,26-17,40	0,510	Beze změny
ABCF2	1,92	0,49-13,02	0,024	Zvýšená
ABCF3	1,27	0,19-18,27	0,552	Beze změny
ABCG1	4,44	0,60-23,35	0,000	Zvýšená
ABCG2	1,79	0,15-24,81	0,189	Beze změny
ABCG4	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
ABCG5	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
ABCG8	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†

Legenda: †- expresi těchto genů nelze hodnotit, neboť je pod hranicí stanovitelnosti (BLQ, below limit of quantification) pomocí zvolené metody.

Kromě *ABCG1* a *ABCC5*, byly nejvýznamněji upregulovány (tedy více jak dvojnásobně, $p \leq 0,001$) geny podrodiny ABCB, jmenovitě *ABCB2*, *ABCB3* a *ABCB4*. Z podrodiny ABCC byly zvýšeně exprimovány *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC5* a *ABCC10*. U všech těchto genů byl již dříve publikovaný vztah k mnohočetné lékové rezistenci.

Dále bylo analyzováno 6 genů SLC transportérů, a to *SLC28A1*, *SLC28A2*, *SLC28A3*, *SLC29A1*, *SLC29A2* a *SLC29A3*. *SLC28A1* byl ve tkáních exprimován pod limitem kvantifikace. *SLC29A3* byl 1,6 krát upregulován v nádorové tkáni ($p=0,033$, více viz tabulka č. 29). Hladiny transkriptů genu *SLC28A2* genu ve sledovaných tkáních silně kolísaly a proto nalezenou upregulaci bude třeba ověřit nezávislou studií.

Tabulka č. 29: Vyhodnocení exprese SLC transportérů v nádorové tkáni vůči kontrolám pomocí softwaru REST 2009

Gen	Poměr hladiny nádor/kontrola	95% CI	P (H1)	Hladina v nádoru
<i>SLC28A1</i>	BLQ†	BLQ†	BLQ†	BLQ†
<i>SLC28A2</i>	278,06	0,0 - 14401936,5	0,027	Zvýšená
<i>SLC28A3</i>	0,97	0,19 - 3,09	0,901	Beze změny
<i>SLC29A1</i>	1,09	0,19 - 17,36	0,826	Beze změny
<i>SLC29A2</i>	1,07	0,22 - 4,61	0,801	Beze změny
<i>SLC29A3</i>	1,58	0,48 - 3,88	0,033	Zvýšená

Legenda: †- expresi těchto genů nelze hodnotit, neboť je pod hranicí stanovitelnosti (BLQ, below limit of quantification) pomocí zvolené metody.

5. DISKUZE

5.1. Význam polymorfismů v biotransformačních enzimech a alterací v genu **CHEK2** pro individuální vnímavost ke karcinomu pankreatu

Karcinom pankreatu zůstává nádorovým onemocněním s velmi vážnou prognózou a velmi vysokou mortalitou. Etiologie a molekulární patogeneze zůstává z velké části neobjasněna. V naší studii jsme potvrdili významný efekt většiny dříve publikovaných rizikových faktorů (věk, pohlaví, chronická pankreatitida, diabetes). Nepozorovali jsme vliv kouření, alkoholu a pití kávy na riziko vzniku tohoto onemocnění, ale jedinci, kteří pili více jak 3 šálky čaje, měli riziko vzniku nádoru pankreatu významně nižší než ostatní. Tyto výsledky potvrdily předchozí polskou studii, kde byl nalezen obdobný trend nižšího rizika vzniku nádoru slinivky ve vztahu k délce pravidelného pití čaje ($p > 0,001$; [129]), ale jsou v rozporu s japonskou studií, kde se pití čaje jako rizikový faktor nepotvrdil [130]. Diskrepance v těchto výsledcích může být spojena s rozdíly v kvalitě a druhu čaje, stejně jako v designu studie. Lze jen spekulovat zda je protektivní efekt způsoben polyfenolickými antioxidanty, kterých je v čaji celá řada [174], nebo jiným mechanismem. V naší studii jsme se zabývali i analýzou genů, které moduluji oxidativní stres (níže), avšak nepodařilo se nám najít pojitko mezi funkčními polymorfismy v klíčových genech obrany vůči oxidativnímu stresu a rizikem vzniku karcinomu pankreatu. Ani nepřímý důkaz naznačující mechanismus ochranného působení čaje proti vzniku karcinomu pankreatu, získaný na relevantní populaci, tedy není k dispozici.

Kromě alterací v genech s vysokou penetrancí může i interakce faktorů vnějšího prostředí s geny s nízkou penetrancí přispívat ke vzniku karcinomu pankreatu. Přestože ostatní typy nádorů byly v minulosti často studovány z hlediska tzv. „gene-environment interactions“ neboli vztahů genů a vnějšího prostředí, nádory pankreatu zůstávaly v tomto ohledu dlouho opomíjeny. Důvodem může být obtížný náběr dostatečného počtu pacientů a vytvoření reprezentativního souboru vzhledem k jejich často špatnému výkonnostnímu stavu a krátkému celkovému přežívání. Naší snahou bylo objasnit, jakou měrou přispívají k vzniku tohoto onemocnění funkčně významné polymorfismy v biotransformačních enzimech ve studii případů a kontrol v české populaci.

V našem souboru byla nalezena prevalence variantní *CYP2A13* alely, způsobující předčasnou zástavu translace v kodonu 101 („knockout allele“ *7), v kontrolní skupině. Vzhledem k tomu, že nebyl nalezen ani jeden nosič této variantní alely u pacientů s karcinomem pankreatu, nemohla být tato závislost statisticky vyjádřena. Nicméně, s přihlédnutím k pilotní studii P450 2A13 u respiračního traktu [41] a faktu, že takto pozměněný protein ztrácí svou enzymatickou aktivitu v metabolické bioaktivaci prokarcinogenů tabákového kouře (a pravděpodobně i dalších environmentálních kontaminant), se naše výsledky jeví jako vysoce relevantní. V genu *CYP2A13* existuje několik

známých polymorfismů. Přestože nejvíce studovaným SNP zůstává Cys varianta v kodónu 257 (rs8192789), asociovaná s nižším rizikem vzniku bronchogenního karcinomu (OR=0,41; 95% CI=0,23-0,71; [131]), jeho funkční dopad na metabolismus NNK *in vivo* není pravděpodobný [132].

Alkohol a aldehyd dehydrogenáza (ADH a ALDH) byly detekovány v tkáni slinivky břišní, přičemž aktivita ADH byla vyšší než aktivita ALDH [133, 134]. Navíc při srovnání nádorové tkáně a zdravého pankreatu byl nalezen výrazný rozdíl pro aktivitu ADH1C. Genotypováním 9080 jedinců bílé rasy bylo zjištěno, že pomalí metabolizátoři etanolu s genotypem ADH1B*1/*1 pijí více alkoholu a mají vyšší riziko vzniku závislosti než rychlí metabolizátoři (ADH1B*2/*2; rs1229984) [135]. K podobným výsledkům dospěla i další studie [136], kde bylo vyšší riziko alkoholismu spojeno s pomalejším metabolismem alkoholu u nosičů haplotypu ADH1B*1-ADH1C*2. Je tedy dobře dokumentován vztah mezi aktivitou enzymů ADH a mírou expozice alkoholu. Vzhledem k výskytu v tkáních pankreatu se ADH stala atraktivním cílem pro další studium etiologie karcinomu pankreatu. Role alkoholu při vzniku nádorů pankreatu je v současnosti poměrně kontroverzní [137, 138]. Genkinger et al. [139] provedli analýzu dat ze 14 prospektivních kohortových studií a získali tak soubor 862 664 jedinců, z nichž 2 187 tvořily sporadické případy karcinomu pankreatu. Závěrem studie je, že existuje mírně vyšší riziko karcinomu pankreatu u osob konzumujících více jak 30g alkoholu denně (RR=1,22; 95% CI=1,03-1,45). V našem souboru jsme však nenalezli ani vztah k abusu alkoholu, ani k polymorfismům v genech *ADH1B* a *ADH1C*, jejichž enzymové produkty metabolizují etanol.

Přestože byl *GSTM1*-null genotyp uveden jako potenciální rizikový faktor pro bronchogenní karcinom [140], podle našich výsledků není pravděpodobné, že významně ovlivňuje riziko karcinomu pankreatu. Naš nálezn na české populaci se shoduje s výsledky amerických studií [59, 141].

V této studii variantní alela *Val* v kodónu 105 *GSTP1* významně zvýšila riziko vzniku karcinomu pankreatu (3,09-krát) u jedinců mladších než 50 let. Role polymorfismů *GSTP1* v patogenezi tohoto typu nádoru byla popsána i dalším pracovištěm [59], přestože na rozdíl od našich výsledků Jiao et al. našli vztah naopak u jedinců starších 62 let. Rozpor ve výsledcích obou studií může být způsoben sledováním malých souborů pacientů, příspěvkem dalších genů a/nebo genotypů, odlišným životním stylem populací nebo rozdílným designem obou studií. U jedinců starších 50 let jsme našli zvýšené riziko vzniku pankreatu u nosičů genotypu *GSTT1-null* (1,56-krát). První studie tohoto enzymu u nádorového onemocnění pankreatu žádné statisticky významné vztahy neukázala [141]. Duell et al. usuzují, že kombinace kouření a delece v *GSTT1* je spojena s vyšším rizikem tohoto onemocnění, a to více u žen než u mužů [142]. V naší studii však kouření neinteragovalo s žádným ze studovaných genů.

Oxidativní stres hraje důležitou roli v patologických stavech tkání včetně zánětu a karcinogeneze [143]. Kyslíkové radikály vznikají jako vedlejší produkty při metabolismu endogenních i exogenních substrátů, metabolismu látek cigaretového kouře i alkoholu [62, 63]. Experimentálně bylo prokázáno, že cigaretový kouř vede k zánětu pankreatu, tj. pankreatitidě [144] právě zvýšením oxidativního stresu buněk [64]. Navíc se zdá, že dysfunkce A-buněk pankreatu u diabetu 2. typu vzniká rovněž působením volných radikálů [65]. Přestože pankreatitida i diabetes mellitus 2. typu vyšly ve studii jako rizikové faktory (ORpancreatitis= 9,93, $p > 0,001$; ORdiabetes= 4,09, $p > 0,001$), tak ani alkohol, ani polymorfismy v *ADH1B* a *ADH1C* genech nebyly s rizikem vzniku tohoto onemocnění asociovány. Vzhledem k tomu jsme předpokládali, že by toto riziko mohlo být ovlivněno změnami ve funkci enzymů antioxidační kapacity (*SOD2* a *SOD3*), nebo enzymů zodpovědných za vytváření oxidativního stresu (*NQO1* a *NQO2*). Genetické polymorfismy kódující superoxid dismutázy a chinon oxidoreduktázy s poškozenou enzymatickou aktivitou a/nebo stabilitou byly často studovány ve vztahu k různým typům nádorů [145, 146]. Snížení genové exprese antioxidačních enzymů včetně *SOD2* bylo popsáno u chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu ve srovnání se zdravou tkání pankreatu [147]. Cullen et al. [148] dokonce popsali *in vitro* potlačení maligního fenotypu pankreatických nádorových buněk při inhibici enzymu *NQO1*. Lze tedy usuzovat, že poškozením intracelulárního redoxního prostředí nádorových pankreatických buněk může dojít k ovlivnění maligního růstu, a tento proces může být jednou z cest v nových možnostech ovlivnění léčby nádorů slinivky břišní. Wheatley-Price et al. [72] publikovali práci, v které popsali vztah mezi rizikem vzniku adenokarcinomu pankreatu a polymorfismy v genech *MPO* (myeloperoxidáza) a *SOD2* (Ala16Val). Jejich sledovaný soubor byl menší než náš ($n=122$) a americká populace se svým genofondem i životním stylem liší od evropské. Tyto faktory mohou být některými z důvodů, proč se naše výsledky rozcházejí a žádné vztahy pro sledované polymorfismy enzymů účastnících se metabolismu volných radikálů nebyly v naší studii nalezeny.

Existuje několik omezení této studie, ke kterým je nutno přihlédnout při interpretaci výsledků.

Prvním z nich je limitovaný počet vzorků s kompletními daty. Zejména při stratifikaci dle věku, kouření a abusu alkoholu a dalších látek vznikly méně početné skupiny pro statistickou analýzu i přesto, že jsme se snažili aby statistická síla studie polymorfismů umožňující zachytit $OR > 1,7$ byla minimálně 80% (Mohelníková et al. *Pancreas* 2011). Je možné, že při získání většího souboru by se závěry a výsledky mohly lišit. Proto by bylo vhodné výsledky pilotní studie potvrdit v rozsáhlejší multicentrické studii, popř. meta-analýzou výsledků více studií.

Mezi další faktory, které mohou být potenciálními zdroji chyb a neměly by být opomíjeny, patří předpokládaná genetická různorodost jednotlivých buněk v rámci tumoru a heterogenita fenotypů nádorů v populaci pacientů. Navíc u inoperabilních případů (což je podstatná část pacientů

s tímto typem nádorového onemocnění) je histologická verifikace diagnózy velmi obtížná a diagnóza se opírá jen o klinické příznaky choroby. Vzhledem k nízké incidenci familiárních případů nelze očekávat, že by mohlo dojít k významnému zkreslení výsledků díky těmto případům.

Kromě polymorfismů v biotransformačních enzymech byly sledovány genetické alterace v genu *CHEK2*, a to jak u karcinomu pankreatu, tak i kolorektálního karcinomu. Důvodem byly zajímavé výsledky, které byly touto analýzou zjištěny u karcinomu prsu v naší populaci a vedly k započetí diskuze o jeho zařazení do skřínku dědičné predisposice [124,175].

Mutace c.470T>C postihující FHA-doménu byla nejčastěji zjištěnou alterací v genu *CHEK2* u pacientů s karcinomem pankreatu (6/269 případů; 2,2%), i u pacientů s kolorektálním karcinomem (30/631 pacientů; 4,8%, [125]). Vzhledem k frekvenci této alterace u kontrolní skupiny (2,5%), není zřejmě významná pro vznik pankreatických nádorů ($p=0,815$). Při porovnání všech alterací v FHA-kódující doméně (c.470T>C, IVS2+1G>A) a její blízkosti (IVS1-5T>A, IVS2+24C>T, IVS2-55C>T, c.538C>T) pak bylo zjištěno jejich vyšší zastoupení u pacientů s karcinomem pankreatu (4/269 případů; 1,5% vs. 2/683 kontrol; 0,3%), stejně jako v předchozí studii u kolorektálního karcinomu (6,2% případů vs. 2,8% kontrol, $p=0,003$; [125]). Na rozdíl od pacientů s nádorovým postižením tlustého střeva a rekta však u pankreatických nádorů byl tento vztah jen na hranici statistické významnosti ($p=0,057$).

Všechny 4 polymorfismy nalezené v intronech *CHEK2* fragmentu byly podrobně popsány v dřívějších studiích na nádorech prsu a kolorekta [124, 125]. Kromě mutace IVS2+1G>A, která prokazatelně poškozuje strukturu proteinu CHEK2 (fs154X), je biologická relevance ostatních změn *in vivo* neznámá. Na základě počítačové modelace Kleibl et al. [124] předpokládají, že variantní alely IVS1-5T>A a IVS2+24C>T mohou interferovat s vazebnými faktory a faktory sestřihu (splicing), zatímco IVS2-55C>T může pravděpodobně postihovat pouze vazebná místa. Záměna c.538C>T (R180C) nalezena u jedné kontroly se nachází v méně konzervativní kódující sekvenci přiléhající k C-konci FHA domény a byla již dříve posána u několika onkologických pacientů. Představuje vzácný a pravděpodobně funkčně nevýznamný polymorfismus [124].

Analýza dalších aktivních míst v *CHEK2* jako jsou delece c.1100delC a del5395 nepřinesla významné výsledky, neboť nebyl nalezen ani jeden nosič těchto delecí u pacientů s nádorem slinivky, ani u pacientů s kolorektálním karcinomem. Tyto alterace tak v naší populaci zůstávají významnými jen u karcinomu prsu [124]. Nicméně, námi studovaný soubor pacientů a kontrol byl relativně malý a některé vztahy mohly být opomenuty v důsledku omezené síly studie.

Role genetických změn v *CHEK2* u sporadické formy adenokarcinomu pankreatu zatím takto detailně nebyla studována. Bartschel et al. [149] identifikovali mezi 35 případy familiární formy

jednoho nosiče 1100delC a předpokládali, že by změny v *CHEK2* mohly mít vliv na rozvoji familiární formy karcinomu pankreatu. Miyasaka et al. [150] popsali aktivaci CHEK2 dráhy u počátečních stádií intraduktálních papilárních mucinózních neoplazií pankreasu (IPMNs) a zároveň poukázali na možnost, že tato změna může hrát roli v potlačení jejich další progresu. Porušení této dráhy, ať již inaktivací *CHEK2* nebo mutací *TP53*, podle tohoto předpokladu přispívá ke karcinogenezi IPMNs.

V obou souborech (pacienti s nádorem pankreatu a pacienti s nádorem kolorekta) nebylo možné studovat úlohu *CHEK2* v etiologii familiární formy, vzhledem k absenci údajů o pacientech s tímto typem onemocnění. Vzhledem k tomu, že polymorfismus I157T byl nedávno publikován, jako rizikový faktor pro mismatch repair-negativní hereditární nepolypomatózní formy kolorektálního karcinomu [151], zůstává otázka alterací genu *CHEK2* u familiárních forem stále otevřená.

5.2. Význam polymorfismů v biotransformačních enzimech pro individuální vnímavost ke kolorektálnímu karcinomu

Česká Republika je na seznamu zemí s nejvyšší incidencí kolorektálního karcinomu na světě. Možnými faktory, které se na tomto faktu podílejí, jsou dietní návyky, zejména příjem tučných jídel založených na smaženém a grilovaném vepřovém mase [155], relativně homogenní genetické pozadí [156], a dobrá úspěšnost záchytu a stanovení diagnózy CRC díky plošně probíhajícímu skríningu a dlouhodobě fungujícímu onkologickému registru.

Hlavním účelem objasnění genetických markerů spojených s nádorovým onemocněním je možnost zaměřit preventivní skríninové programy na jedince ve vyšším, nebo vysokém riziku vzniku maligního onemocnění (FOBT, kolonoskopie) a schopnost intervence směřující na prevenci kolorektálního karcinomu u těchto osob (změny v dietních zvycích, omezení kouření, obezity apod).

Studie týkající se polymorfismů v genech kódujících biotransformační enzymy a jejich vztahu k nádorovým onemocněním musí být dobře zmapované z hlediska možných faktorů, které mohou výsledky ovlivňovat. Jedná se zejména o věk a pohlaví účastníků studie, stejně tak jako další rizikové faktory nádorových onemocnění - kouření, obezita apod. [154, 157]. V této práci bylo vzato mezi sledované faktory, které mohou ovlivnit výsledky i vzdělání, protože vypovídá o předpokládané socio-ekonomické situaci pacientů, což je rovněž považováno za potenciálně důležitý faktor. Bydliště (městské oblasti vs. venkov) se jeví jako důležité z hlediska životního stylu tamních obyvatel a míry kontaminace životního prostředí polutanty. Obojí, bydliště i vzdělání, se k těmto účelům běžně sledují [158]. K výběru vhodných kontrol byla použita skupina pacientů s provedenou kolonoskopií s negativním závěrem, jelikož kolonoskopie je v současnosti považována za metodu, která je schopna objektivně vyloučit nádorové postižení tlustého střeva a konečníku [159].

Frekvence variantních alel ve sledovaných polymorfismech biotransformačních enzymů se nelišila u kontrolní skupiny od frekvencí v dříve publikovaných studiích na české populaci [128, 154]. Polymorfismy v *EPHX1* (a to ani jejich vzájemné kombinace), *GSTP1* a *NQO1* neměly významný vztah k riziku vzniku kolorektálního karcinomu. Výsledky získané v této studii korespondují s některými dříve publikovanými pracemi (*EPHX1* - negativní výsledky [46, 47, 153]), ale nepotvrdily výsledky publikované jinými laboratořemi (*NQO1* jako rizikový faktor [48, 152, 161]; *EPHX1* jako protektivní faktor [160]). Je obecně přijímáno, že studie tohoto typu jsou populačně velmi specifické, a liší se, jak genetickým pozadím studované populace, tak i životním stylem a návyky. Tento fakt, spolu s obvykle různým pojetím náběru vzorků a použitou metodikou stanovení polymorfismů, má za následek vznik některých rozporů ve výsledcích. K interpretaci výsledků je tedy nezbytné mít

dostatečně velký soubor vzorků z etnicky dobře definované populace a pokud možno výsledky replikovat na nezávislých populacích, které se neliší v genetickém pozadí a životním stylu [128,176].

V této studii bylo nalezeno vyšší riziko vzniku kolorektálního karcinomu u jedinců s *GSTM1-null* genotypem (1,3-krát vyšší), které bylo ještě výraznější při kombinaci s *GSTT1-null* genotypem (1,6-krát). *GSTM1-null* a *GSTT1-null* genotypy byly identifikovány jako rizikové faktory kolorektálního karcinomu rovněž v turecké (OR=1,62 a OR=1,64, [162]) a v japonské populaci [163]. Zvýšení rizika vzniku kolorektálního karcinomu u nosičů *GSTM1-null* (OR=1,41) bylo pozorováno i ve Velké Británii, přestože tento vztah nedosáhl statistické významnosti [164]. Na druhou stranu, ve studii prováděné v oblasti Skotska [165] se žádný vztah mezi polymorfismy *GSTM1* nebo *GSTT1* a rizikem vzniku a rozvoje kolorektálního karcinomu prokázat nepodařilo. Kombinace delece *GSTM1* a *GSTT1* se jevila jako rizikový faktor pro rozvoj tumoru v příčném tračniku a rektu [162]. Funkční studie na 208 německých jedincích, kteří podstoupili kolonoskopii, ukázala pokles aktivity GST a exprese *GSTP1* ve směru od proximálního tračniku k jeho distálnímu konci [166]. Navíc, *GSTP1* se zdá být relevantní i pro terapii kolorektálního karcinomu. Pacienti léčení kombinací 5-fluorouracilu s oxaliplatinou vykazovali lepší přežívání pokud byli nosiči variantní alely funkčního polymorfismu *GSTP1* v kodonu 105 [167]. Kromě významu těchto enzymů pro predikci rizika vzniku onemocnění je tedy pravděpodobné, že testování polymorfismů námi sledovaných genů bude využito i pro predikci účinků chemoterapie.

Huang et al. [168] ve své práci na populaci afroameričanů a američanů evropského původu popsali vztahy mezi polymorfismy v genech *GSTT1* a *GSTM1* a mírně vyšším rizikem kolorektálního karcinomu. Autoři této studie naznačili možnost etnických odlišností ve vztahu mezi kouřením a genetickou výbavou jedince. V naší studii na homogenní české populaci se však modifikující efekt kouření nepodařilo potvrdit. Moore et al. [169] publikoval vztah mezi vilózním adenomem kolorekta (považován za prekancerózu) a *GSTM1-plus* i *GSTT1-null* genotypy u kuřáků. Roli *GSTM1-null* genotypu jako potenciálního rizikového faktoru kolorektálního karcinomu, zejména u bělošské populace, potvrdila i nedávná metaanalýza [170].

Dosud publikované výsledky, ve spojení s daty získanými v této dizertační práci, ukazují na určitou roli biotransformačních enzymů, především glutathion *S*-transferáz, v rozvoji kolorektálního karcinomu. Přesnou povahu a význam těchto interakcí je třeba dále detailně studovat na větších souborech jedinců. Některé subpopulace mohou mít vyšší vnímavost k rozvoji malignit a mechanismy, které se na tomto faktu podílejí, se mohou lišit.

Limitace v interpretaci výsledků této studie vlivu polymorfismů genů biotransformace na vznik a rozvoj kolorektálního karcinomu, zejména v oblasti síly studie a kompletnosti sledovaných dat, jsou podobné jako u podobně koncipované studie karcinomu pankreatu (viz. str. 73).

5.3. Identifikace referenčních genů pro qPCR tkání karcinomu pankreatu

Výzkum nádorů slinivky břišní je velmi obtížný, zejména co se týká získávání kvalitních vzorků tkání a dat u pacientů s krátkou dobou celkového přežívání a špatným výkonnostním stavem. Většina pacientů má v době diagnózy již inoperabilní stádium tumoru, takže není možné z etických důvodů získat tkáň k histologické verifikaci. Navíc, vzhledem k vysokému množství degradačních enzymů, jako jsou zejména RNázy, přítomných v pankreatické tkáni od operovaných pacientů, je velmi obtížné vyizolovat dostatečně množství kvalitní RNA. Z těchto důvodů je velmi důležité sestavit a dodržovat vhodný protokol náběru vzorků, jejich transportu a další manipulace, včetně izolace nukleových kyselin, kontroly jejich kvality a skladování.

Jedním z úkolů této práce bylo zavést protokol nakládání se vzorky tkání pankreatu, izolace a kontroly kvantity i kvality RNA preparátů. Dalším úkolem bylo identifikovat nejstabilnější endogenní kontrolní geny ve studovaných vzorcích získaných od pacientů s adenokarcinomem slinivky břišní, které budou sloužit pro další analýzy hladin transkriptů kandidátních genů pomocí qPCR metody. Pozornost byla věnována zejména kvalitě RNA, efektu degradace na výsledky qPCR a otázce minimalizace těchto efektů vhodnou normalizací výsledků.

Vzorky byly nabírány za striktně shodných podmínek (reprezentativní vzorek tumoru i přilehlé tkáně slinivky bez nádorových změn byly odebrány z chirurgického resektátu ve stejnou dobu a okamžitě zmrazeny) a i další zpracování, skladování a izolace se nelišily. Přesto jsme našli významný rozdíl v kvalitě RNA hodnocené pomocí RIN mezi nádorovou tkání a kontrolní pankreatickou tkání bez nádorových změn. U všech deseti párů vzorků nádorová tkáň vykazovala nižší stupeň degradace RNA vůči své párové kontrolní tkáni. Nabízí se tedy otázka, zda je množství RNAáz v tumoru významně nižší než ve výchozí tkáni slinivky. Již dříve bylo publikováno, že doba ischemie díky ligaci velkých cév zásobujících pankreas a duodenum během operace je z hlediska genetických analýz příliš dlouhá a způsobuje masivní degradaci RNA. Bohužel je doba ischemie tkáně během těchto rozsáhlých výkonů na pankreatu faktorem, který nelze eliminovat, a izolace RNA je tak u vzorků pankreatu velmi obtížnou procedúrou [116]. Průměrný RIN v námi hodnocených nádorech byl $6,4 \pm 1,0$ a v okolní kontrolní tkáni $3,2 \pm 1,6$. Toto zjištění je ve shodě s dříve otištěnou prací, která uvádí, že RIN u RNA izolované z různých tkání se obvykle pohybuje mezi 6-8, kromě tkání gastrointestinálního traktu, kde jsou výraznější rozdíly s RINem kolem 4. Navíc tyto výsledky byly zaznamenány na orgánech skotu, tudíž za podmínek, které jsou pro získání RNA významně výhodnější ve srovnání s chirurgickými výkony, u nichž je na prvním místě výsledek operace a další osud pacienta [171].

Fleige et al. [114] našli významný vliv hodnoty RIN na výsledek qPCR, zejména na počet cyklů PCR (Ct) a méně pak na úspěšnost PCR reakce (E). Antonov et al. [172] dále demonstrovali na biologicky homogenním materiálu intaktní a částečně degradované RNA z buněčných linií, že degradací způsobený posun v Ct hodnotách může být kompenzován pomocí výpočtů deltaCt mezi testovanými geny a průměrným Ct několika referenčních genů. Tyto deltaCt hodnoty byly méně citlivé k fragmentaci RNA a nebyly ovlivněny ani rozdílným množstvím použité RNA. V našem experimentu korelovalo průměrné Ct všech testovaných genů v kontrolní tkáni s RIN. Použili jsme normalizaci pomocí interního standardu 18S (Ct_{genu}/Ct_{18S}), čímž došlo k normalizaci vztahu mezi RINem a Ct hodnotou studovaných genů. U nádorové tkáně nebyla významná korelace pozorována před ani po této normalizaci a u tkáně kontrolní tato normalizace korelaci zcela eliminovala.

Demonstrovali jsme tedy, že degradací způsobený posun v Ct hodnotách, u expresních studií pomocí qPCR metody, lze kompenzovat normalizací Ct sledovaných genu pomocí Ct hodnoty endogenní kontroly genu 18S.

Provedli jsme stanovení hladin transkriptů 24 kandidátních referenčních genů vybraných z komerčně dostupných endogenních kontrol. V literatuře je popsáno několik přístupů, jak vybrat nejstabilnější referenční geny pro qPCR, včetně různých programů k hodnocení výsledků. Pro tuto analýzu byly vybrány 2 nejčastěji používané programy a to NormFinder a geNorm. Oba tyto programy vyhodnotily výsledky podobně, přestože se pořadí genů podle stability zcela neshodovalo. Geny *EIF2B1*, *ELF1*, *MRPL19* a *POP4* však patřily mezi nejstabilnější ve výsledcích obou programů. Účinnost qPCR reakce, stejně jako sklon a linearita kalibračních křivek referenčních genů by měla být prověřena před samotným profilováním [173]. Ověřili jsme tedy, že námi vybrané geny splňují kritéria pro použití v qPCR dle MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, [115]) a můžeme tyto referenční geny použít pro další studium pankreatických nádorů pomocí qPCR.

5.4. Expresní studie ABC a SLC transportérů u karcinomu pankreatu

ABC transportéry hrají významnou roli v mnoha aspektech nádorových onemocnění. Kromě výše zmíněné a dobře známé mnohočetné lékové rezistence, která byla popsána u 14 zástupců této rodiny enzymů, se ABC transportéry podílejí i na vzniku a rozvoji nádorového procesu.

König et al. [98] stanovovali pomocí real-time PCR hladiny exprese mRNA devíti členů ABCC podrodiny a genu ABCG2 ve vzorcích tkáně zdravé nenádorové slinivky břišní a v nádorech pankreatu (n=37). V tomto souboru byla nalezena jak v nádorové, tak i nenádorové tkáni exprese mRNA genů ABCC1, ABCC3, ABCC4 a ABCC5. cDNA fragmenty odpovídající délky byly identifikovány i pro geny ABCC2, ABCC6, ABCC10 a ABCC12, ale míra jejich amplifikace po korelaci s mRNA expresí beta-aktinu byla velmi nízká a *ABCC11* nebyl amplifikován vůbec. V našem souboru vzorků byly hladiny exprese mRNA *ABCC11*, *ABCC12* a *ABCC13* rovněž velmi nízké, ale na rozdíl od předchozí studie zde byly naměřeny dobře detekovatelné hladiny transkriptů pro geny ABCC2, ABCC6 a ABCC10. Bylo popsáno, že se hladiny expresí mRNA *ABCC1* a *ABCC4* neliší mezi nádorovou a nenádorovou tkání slinivky břišní, zatímco v tkáni karcinomu pankreatu dochází k upregulaci genů ABCC3 a ABCC5 [98]. Autoři usuzují, že právě tyto geny (*ABCC3* a *ABCC5*) jsou zapojeny do vzniku chemorezistence buněk adenokarcinomu pankreatu vůči cytostatikům a analýza jejich exprese u pacientů může přispět ke zlepšení predikce jejich odpovědi na terapii. Naše studie potvrdila upregulaci *ABCC3* a *ABCC5* v nádorové tkáni na nezávislém souboru vzorků. Na rozdíl od předchozí studie jsme našli rovněž upregulaci v nádorech u dalších dvou genů (*ABCC1* a *ABCC10*). *ABCC1* protein zajišťuje transmembránový transport celé řady léků, včetně cytostatik, a může hrát roli při vzniku lékové rezistence u řady maligních nádorů jako jsou nádory prsu, prostaty a neuroblastomu [177]. Zvýšená exprese mRNA genu *ABCC10* byla zjištěna u buněčných linií rezistentních k doxorubicinu (MCF7), a exprese tohoto genu se zdá být závislá na aktivaci genu *TP53* [178]. Nicméně, nukleotidová analoga, která jsou nejvíce využívána při léčbě pacientů s karcinomem pankreatu, nejsou substrátem přenašeče *ABCC10* [96].

Úloha rodiny ABCC transportérů v chemorezistenci nádorů pankreatu vůči nukleotidovým analogům tedy zůstává stále neobjasněna. Exprese *ABCC5* mRNA v buněčných liniích adenokarcinomu pankreatu významně korelovala s jejich citlivostí vůči 5-fluorouracilu (5-FU) ($r^2 = 0,738$, $p < 0,05$) [179]. Tyto výsledky poukazují na fakt, že *ABCC5* protein je exprimován a plně funkční v buňkách karcinomu pankreatu a přispívá k jejich chemorezistenci vůči 5-FU. Nám se podařilo zjistit, že je v nádorových buňkách *ex vivo* karcinomu pankreatu exprimován ve vyšší míře než v okolní nenádorové tkáni. Pro objasnění bližších vztahů mezi mírou exprese, jeho aktivitou a nádorovou rezistencí je však nutný další podrobnější výzkum.

ABCB4 translokuje lipidy jako fosfatidylcholin z vnitřní na vnější stranu membrány hepatocytu. Jeho aktivita je pro správnou funkci jaterních buněk klíčová, neboť u jedinců s defektním ABCB4 proteinem dochází k rozvoji závažných jaterních onemocnění (např. progresivní familiární intrahepatická cholestáza 3. typu) [180]. Mutace v genu *ABCC4* byly nalezeny i u pacientů s rekurentní biliární pankreatitidou [181]. *In vitro*, bylo prokázáno, že overexprese *ABCB4* přispívá k rezistenci buněk vůči řadě chemoterapeutik, jako např. paklitaxelu, nebo doxorubicinu [182,183].

Námi vysledovaná upregulace genů *ABCB4*, *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC5* a *ABCC10* ($p \leq 0,005$) v tumorózní tkáni pankreasu je tedy v souladu s jejich již stanoveným fenotypem mnohočetné lékové rezistence. Na základě výsledků této pilotní studie lze usuzovat, že tyto ABC transportéry mohou být možnými genetickými markery nádorové odpovědi, a je třeba provést další podrobnější analýzy, jak tento fenotyp tumorů koreluje s léčebnou odpovědí pacientů.

Nádorové buňky dokáží uniknout před rozpoznáním T-lymfocytů (tumor antigen- specifické cytotoxické T lymfocyty- CTL) pomocí downregulace komponent účastnících se procesu rozpoznání a prezentace antigenu (antigen processing machinery- APM). Mezi tyto komponenty patří transportéry spojené s přípravou antigenu pro prezentaci (*TAP1/ABCB2* a *TAP2/ABCB3*) [184,185,186]. V našem souboru jsme našli významnou upregulaci těchto dvou ABC transportérů v nádorové tkáni. Defektní exprese molekul *HLA-I* a APM komponent byla nalezena v souvislosti se špatnou prognózou nádorového onemocnění, zejména u nádorů kolorekta [187,188,189]. Podle našich výsledků se další výzkum deregulace genů podílejících se na zpracování antigenu a jejich významu v prognóze pacientů s nádory pankreatu se ukazuje jako zajímavé téma pro další studie.

Naopak byly nalezeny čtyři geny downregulované v tumorech pankreatu, a to *ABCA3*, *ABCA5*, *ABCC6* a *ABCC7*. *ABCA3* transportér je nejvíce exprimován v plicní tkáni, ale jeho exprese byla nalezena také v mozku, srdci a tkáni zdravé slinivky břišní [190]. Mutace tohoto genu jsou spojeny se syndromem dechové tísně a nedostatkem surfaktantu u novorozenců [191]. Funkce *ABCA3* v tkáních pankreatu zatím nebyla objasněna.

Mutace v genu *ABCC6* se vyskytují u multisystémového onemocnění *Pseudoxanthoma elasticum*, kdy dochází k ektopické mineralizaci pojivové tkáně [192]. Jeho přítomnost a funkce ve tkáních slinivky nebo jejích nádorech zatím nebyla studována. Mutace *CFTR/ABCC7* jsou podkladem pro závažné onemocnění cystickou fibrózou [193]. Navíc transportér *ABCC7* váže syntaxin 1A (regulátor membránové fúze) [194], sodný kanál [195] a endocystický adaptórový komplex AP-2 [196].

Díky existenci těchto závažných genetických poruch se tak ukazuje, že ABC transportéry, jako komponenty větších membránových komplexů, se s největší pravděpodobností podílejí na širším

spektru biologických aktivit. Vzhledem k nedostatku údajů v literatuře o významu těchto genů pro vznik, vývoj a terapii nádorů slinivky, zůstává jejich zjištěná downregulace předmětem spekulací a slibným polem pro další výzkum.

Studie hladin transkriptů genů v tkáních bez korelace s expresí proteinů stanovenou imunohistochemicky se jeví jako jedna z největších limitací této práce. Nicméně imunohistochemická analýza je semi-kvantitativní metodou a odráží pouze přítomnost proteinů bez průkazu jejich skutečné aktivity. Navíc stanovování přítomnosti proteinů je silně ovlivněno i volbou protilátek, jejich specifitou a selektivitou. Korelace mezi mírou exprese genů a jimi kódovaných proteinů je v případě ABC transportérů zatím málo známá a míra genové transkripce se považuje za nezávislý ukazatel ABC exprese ve tkáních. Pro stanovování hladin transkriptů byla využita metoda založená na polymerázové řetězové reakci v reálném čase, která je v současnosti považována za přesnější metodu ve srovnání se semi-kvantitativními metodami (imunohistochemie, RT-PCR, apod.). Mezi další limitace patří malý soubor pacientů a absence klinických dat týkajících se léčby a průběhu onemocnění. Proto všechny tyto výsledky musí být interpretovány s přihlednutím k těmto limitacím a je nezbytné je ověřit pomocí dalších typů analýz na větším souboru vzorků.

6. ZÁVĚRY

V České republice má incidence zhoubných nádorů kolorekta a pankreatu trvale rostoucí charakter. Etiologie a patogeneze těchto onemocnění není stále objasněna. Porozumění této problematice by mohlo nejen zvýšit účinnost prevence (vytipování rizikových skupin a potřebných skrínigových vyšetření), ale mohlo by významně ovlivnit i léčbu. Následně by se významně snížily náklady vynaložené na diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění.

Cíl práce se opíral o hypotézu, že polymorfismy v biotransformačních enzimech mohou ovlivňovat riziko karcinogeneze. Prvním úkolem tohoto projektu bylo studovat vztahy mezi polymorfismy v genech metabolismu složek cigaretového kouře a alkoholu, jmenovitě *CYP2A13*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *NQO1*, *NQO2*, *SOD2*, *SOD3*, *ADH1B* a *ADH1C* a rizikem vzniku karcinomu kolorekta a pankreatu. Pomocí metody PCR-RFLP, alel-specifické PCR reakce a PCR v reálném čase bylo vyšetřeno 235 pacientů s diagnózou nádorového onemocnění slinivky břišní, 495 pacientů s kolorektálním karcinomem a 760 zdravých kontrol bez přítomnosti onkologického onemocnění.

Pro většinu námi sledovaných polymorfismů se nepodařilo prokázat vztah mezi jejich přítomností a rizikem vzniku obou těchto malignit. Negativní výsledky studií jsou cenným příspěvkem do meta-analýz, které podávají ucelenou informaci o významu genetických faktorů v etiologii onemocnění. Podařilo se nám získat některé prioritní a zajímavé výsledky. Variantní alela *CYP2A13**7 (*Arg101STOP*), kódující inaktivní enzym byla nalezena u 7 z 265 hodnocených zdravých kontrol, ale nebyla nalezena u žádného pacienta s karcinomem pankreatu (n=235). Tento silný trend, u kterého vzhledem k absenci variantní alely v souboru pacientů nelze vyjádřit statistickou významnost, naznačuje možnost úlohy genu *CYP2A13* v etiologii karcinomu pankreatu. Výskyt variantní alely *GSTP1-Val* a genotypu *GSTT1-null* byl naopak spojen se zvýšeným rizikem vzniku nádoru pankreatu (OR=2,38; 95% CI=1,17-4,83). V souboru pacientů s kolorektálním karcinomem byl genotyp *GSTT1-null* v kombinaci s *GSTM1-null* genotypem spojen s mírně zvýšeným rizikem (OR=1,58; 95% CI=1,01-2,47) a samotná delece *GSTM1* zvyšovala riziko kolorektálního karcinomu po zohlednění ostatních sledovaných faktorů (OR=1,30; 95% CI=1,01-1,68).

Naše výsledky ukazují, že polymorfismy v genech kódující biotransformační enzymy, zejména aktivační cytochrom P450 2A13 a detoxikační glutation S-transferázy, mohou ovlivňovat riziko vzniku maligního onemocnění slinivky břišní a tlustého střeva v české populaci. Výsledky získané v rámci uvedené pilotní studie jsou dobrým základem pro nutné ověřující analýzy na větších souborech pacientů, eventuálně meta-analýzy souborů charakterizujících bělošskou populaci s obdobným životním stylem.

Dalším úkolem bylo charakterizovat úlohu vybraných funkčně významných alterací v genu CHEK2 (FHA doména s přilehlou oblastí, del1100, rozsáhlá delece del 5395bp) v patogenezi sporadického karcinomu pankreatu. Checkpoint kináza 2 je enzym zapojený v procesu zachování integrity genomu, regulace buněčného cyklu a apoptózy. Řada předchozích analýz uvádí CHEK2 jako gen, jehož mutace potenciálně zvyšují riziko vzniku řady nádorových onemocnění. Stejně jako dříve v případě kolorektálního karcinomu, i v naší studii bylo riziko vyšší pro jedince s přítomnou mutací v oblasti FHA domény, avšak tento vztah byl na hraně statistické významnosti ($p=0,057$). Delece 5395 bp nebyla v žádném ze sledovaných souborů nalezena a zůstává tak zatím významnou pouze pro karcinom prsu v naší populaci.

Další hypotéza byla postavena na faktu, že pacienti s nádory odpovídají rozdílně na podanou chemoterapii. V řadě modelových systémů byly identifikovány geny interagující s účinkem cytostatik používaných pro léčbu karcinomu kolorekta a pankreatu. Rozdílné exprese těchto genů by tedy měly být hlavním důvodem pro vznik rezistence vůči chemoterapii. Pro studium rozdílů expresí genů 3. fáze biotransformace (zejména ABC transportérů) bylo nutné zavedení optimální metodiky.

Karcinom pankreatu se řadí k velmi problematickým nádorům z hlediska analýzy genové exprese, a to díky obtížnému náběru vzorků i izolace RNA pro vysoký obsah degradačních enzymů ve tkáni. Podařilo se nalézt optimální protokol odběru tkáně, transportu, skladování, izolace celkové RNA s následnou analýzou její kvality a kvantity podle nejnovějších metod a doporučení. Úkolem této práce bylo i identifikovat nejstabilnější referenční geny ve studovaných vzorcích získaných od pacientů s adenokarcinomem slinivky břišní, které budou sloužit pro normalizaci výsledků analýzy pomocí qPCR metody. Provedli jsme skrínig 24 kandidátních referenčních genů, vybraných z komerčně dostupných endogenních kontrol. Ověřili jsme, že námi vybrané nejstabilnější geny v pankreatické tkáni a karcinomu pankreatu *EIF2B1*, *ELF1*, *MRPL19* a *POP4* splňují všechna potřebná kritéria a jsou vhodnými pro studium pankreatických nádorů pomocí qPCR.

Porovnáním exprese všech 49 členů lidské nadrodiny ABC transportérů u deseti vzorků nádoru pankreatu s okolní nenádorovou tkání pankreatu pomocí qPCR jsme zjistili, že 11 genů bylo statisticky významně upregulováno a 4 downregulovány ($p<0,05$) v tkáni adenokarcinomu. Zjištěná zvýšená exprese *ABCB2* (2,2x), *ABCB3* (2,2x), *ABCB4* (5,3x), *ABCC1* (1,6x), *ABCC5* (2,2x) v nádorové tkáni může, ve shodě s jejich dříve prokázaným fenotypem mnohočetné lékové rezistence, ovlivnit výsledek léčby onemocnění. Downregulace *ABCA3* ($p = 0,002$), *ABCA5* ($p = 0,010$), *ABCC6* ($p < 0,001$) a *ABCC7* ($p = 0,016$) ve tkáni karcinomu pankreatu zatím nebyla publikována.

Výsledky pilotní studie zaměřené na expresi ABC transportérů ve tkáni karcinomu pankreatu tedy prokázaly významné rozdíly v hladinách transkriptů těchto membránových enzymů, které jsou klíčové pro transport cytostatik ven z nádorových buněk. K ověření výsledků pilotní studie probíhá

rozsáhlejší studie, kde bude navíc zohledněna i odpověď na podávanou chemoterapii. Pomocí metodiky zavedené v této práci nyní na našem pracovišti probíhá výzkum exprese ABC transportérů a hodnocení jejich významu pro výsledek chemoterapie u kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu.

7. PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli RNDr. Pavlu Součkovi, CSc., který mě uvedl do problematiky analýzy genů přispívajících ke vzniku nádorových onemocnění. Velmi si cením jeho rad, podpory a taktního směřování k cíli. Za cenné rady a inspirující debaty, které významně ovlivnily mé studium a práci bych dále chtěla poděkovat hlavně RNDr. Radce Václavíkové, PhD. a Ing. Simoně Šůsové. Všem spolupracovníkům a kamarádům z Laboratoří toxikogenomiky děkuji za pomoc při práci v laboratoři a výuku základních genetických metod nutných k mé práci. V neposlední řadě děkuji i kolegům ze spolupracujících laboratoří za možnost využití jejich přístrojového vybavení a vstřícný postoj, jmenovitě doc. MUDr. Zdeňku Kleiblovi, PhD. s kolektivem a MUDr. Pavlu Vodičkovi, CSc. s kolektivem a spolupracujícím klinickým pracovištěm a lékařům.

V Praze dne 1. února 2012.

Tato práce vznikla za podpory IGA MZ ČR 9422-3/2007, IGA MZ ČR 9799-4/2008, IGA MZ ČR NS/10230-3/2009, GAČR 304/10/1286 a GAČR 310/07/1430.

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. **2006**;24: 2137-2150.
2. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. **2007**;18: 581-592.
3. Novotvary 2007 ČR. IHIS ČR, NOR ČR, Česká Republika, pp24-30, **2010**. ISBN 978-80-7280-849-6.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. **2008**;58(2):71-96.
5. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. **2010** Jun 17. [Epub ahead of print]
6. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, Bergmann MM, Nieters A, Linseisen J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tountas Y, Berrino F, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Engeset D, Lund E, Skeie G, Ardanaz E, González C, Navarro C, Quirós JR, Sanchez MJ, Berglund G, Mattisson I, Hallmans G, Palmqvist R, Day NE, Khaw KT, Key TJ, San Joaquin M, Hémon B, Saracci R, Kaaks R, Riboli E. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*. **2005**;97: 906-916.
7. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. **2009**;124: 2406-2415.
8. Lo AC, Soliman AS, El-Ghawalby N, Abdel-Wahab M, Fathy O, Khaled HM, Omar S, Hamilton SR, Greenson JK, Abbruzzese JL.. Lifestyle, occupational, and reproductive factors in relation to pancreatic cancer risk. *Pancreas*. **2007**;35:120-129.
9. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA*. **1995**;273:1605-1609.
10. Mukesh V. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat*. **2005**;4:295-301.
11. Kiyohara. Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer. *J Epidemiol*. **2000**;10:349–360.
12. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol*. **2008**;3:157–188.
13. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. **2000**;343:78–85.
14. Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Howarth K, Pittman AM, Spain S,

- Lubbe S, Walther A, Sullivan K, Jaeger E, Fielding S, Rowan A, Vijayakrishnan J, Domingo E, Chandler I, Kemp Z, Qureshi M, Farrington SM, Tenesa A, Prendergast JG, Barnetson RA, Penegar S, Barclay E, Wood W, Martin L, Gorman M, Thomas H, Peto J, Bishop DT, Gray R, Maher ER, Lucassen A, Kerr D, Evans DG; CORGI Consortium, Schafmayer C, Buch S, Völzke H, Hampe J, Schreiber S, John U, Koessler T, Pharoah P, van Wezel T, Morreau H, Wijnen JT, Hopper JL, Southey MC, Giles GG, Severi G, Castellví-Bel S, Ruiz-Ponte C, Carracedo A, Castells A; EPICOLON Consortium, Försti A, Hemminki K, Vodicka P, Naccarati A, Lipton L, Ho JW, Cheng KK, Sham PC, Luk J, Agúndez JA, Ladero JM, de la Hoya M, Caldés T, Niittymäki I, Tuupanen S, Karh A, Aaltonen L, Cazier JB, Campbell H, Dunlop MG, Houlston RS. A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet.* **2008**;40:623-30.
15. Houlston RS, Cheadle J, Dobbins SE, Tenesa A, Jones AM, Howarth K, Spain SL, Broderick P, Domingo E, Farrington S, Prendergast JG, Pittman AM, Theodoratou E, Smith CG, Olver B, Walther A, Barnetson RA, Churchman M, Jaeger EE, Penegar S, Barclay E, Martin L, Gorman M, Mager R, Johnstone E, Midgley R, Niittymäki I, Tuupanen S, Colley J, Idziaszczyk S; COGENT Consortium, Thomas HJ, Lucassen AM, Evans DG, Maher ER; CORGI Consortium; COIN Collaborative Group; COINB Collaborative Group, Maughan T, Dimas A, Dermitzakis E, Cazier JB, Aaltonen LA, Pharoah P, Kerr DJ, Carvajal-Carmona LG, Campbell H, Dunlop MG, Tomlinson IP. (2010) Meta-analysis of three genome-wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33. *Nat Genet.* **2010**;42:973-7.
16. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell.* **2003**;3(5):421-9.
17. Vilasová Z, Österreicher J, Vávrová J. Biodozimetrie I: Praktická potřeba biodozimetrie a nejdůležitější aktivované mechanismy po ozáření. *Vojenské zdravotnické listy.* **2005**;r. LXXIV, č.2.
18. Kleibl Z, Novotný J, Malík R, Bezdičková D, Kleiblová P, Foretová L, Krutílková V, Cínek M, Ilenčíková D, Petruželka L, Matouš B, Pohlreich P. Výskyt a význam mutace CHEK2*1100delC u pacientek s karcinomem prsu a v kontrolní skupině zdravých žen v České republice. *Klinická onkologie.* **2005**;18:98-101.
19. Schutte M, Seal S, Barfoot R, Meijers-Heijboer H, Wasielewski M, Evans DG, Eccles D, Meijers C, Lohman F, Klijn J, van den Ouweland A, Futreal PA, Nathanson KL, Weber BL, Easton DF, Stratton MR, Rahman N; Breast Cancer Linkage Consortium. Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *Am J Hum Genet.* **2003**;72(4):1023-8.
20. Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, Wasielewski M, Wagner A, Hollestelle A, Elstrodt F, van den Bos R, de Snoo A, Fat GT, Brekelmans C, Jagmohan S, Franken P, Verkuijlen P, van den

- Ouweland A, Chapman P, Tops C, Möslein G, Burn J, Lynch H, Klijn J, Fodde R, Schutte M. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet.* **2003**;72(5):1308-14.
21. Kilpivaara O, Vahteristo P, Falck J, Syrjäkoski K, Eerola H, Easton D, Bartkova J, Lukas J, Heikkilä P, Aittomäki K, Holli K, Blomqvist C, Kallioniemi OP, Bartek J, Nevanlinna H. CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer.* **2004**;111(4):543-7.
22. Petruželka L, Konopásek B, Aschermannová A, Helmichová E, Janků F, Kleibl Z, Mališ J, Mareš P, Novotný J, Příbylová O, Špička I, Tesařová P. Klinická onkologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze- Nakladatelství Karolinum, pp145-148, **2003**. ISBN 80-246-0395-0.
23. Klener P, Abrahámová J, Fait V, Mališ J, Matějovský Z, Petruželka L, Žaloudík J. Klinická onkologie. Praha, Galén, pp 429-433, **2002**. ISBN 80-7262-151-3.
24. Pannala R, Basu A, Petersen GM, Chari ST. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol.* **2009**;10:88-95.
25. Galmarini CM., Clarke ML, Jordheim L, Santos CL, Cros E, Mackey JR, Dumontet C. Resistance to gemcitabine in a human follicular lymphoma cell line is due to partial deletion of the deoxycytidine kinase gene. *BMC Pharmacol.* **2004**;4:8.
26. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvement in survival and clinical benefit with gemcitabine as first line therapy for patients with advanced pancreatic cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* **1997** ;15:2403-2413.
27. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology; Pancreatic Adenocarcinoma v.2.2010. (www.nccn.org, date accessed: 14 October 2010).
28. Berlin JD, Adak S, Vaughn DJ, et al. (2000). A phase II study of gemcitabine and 5-fluorouracil in metastatic pancreatic cancer: and Eastern Cooperative Oncology Group study (E3296). *Oncology*, **58**, 215-218.
29. Herrmann R, Bodoky G, Ruhstaller T, Glimelius B, Bajetta E, Schüller J, Saletti P, Bauer J, Figer A, Pestalozzi B, Köhne CH, Mingrone W, Stemmer SM, Tamas K, Kornek GV, Koeberle D, Cina S, Bernhard J, Dietrich D, Scheithauer W. Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the swiss group for clinical cancer research and the central European cooperative oncology group. *J Clin Oncol.* **2007**;25:2212-2217.
30. Erkan M, Kleeff J, Esposito I, Giese T, Ketterer K, Büchler MW, Giese NA, Friess H. Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene.* **2005**;24(27):4421-4432.
31. Heinemann V, Shulz L, Issels RD, Plunkett W. Gemcitabine: a modulator of intracellular

- nucleotide and deoxynucleotide metabolism. *Semin Oncol.* **1995**;22:11-18.
32. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* **2000**;19:5548-5557.
33. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res.* **2001**;7:2958-2970.
34. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Clin Oncol.* **2007**;25:1960-1966.
35. Johnson JR, Cohen M, Sridhara R, Chen YF, Williams GM, Duan J, Gobburu J, Booth B, Benson K, Leighton J, Hsieh LS, Chidambaram N, Zimmerman P, Pazdur R. Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen. *Clin Cancer Res.* **2005**;11:6414-6421.
36. Lu JF, Eppler SM, Wolf J, Hamilton M, Rakhit A, Bruno R, Lum BL. Clinical pharmacokinetics of erlotinib in patients with solid tumors and exposure-safety relationship in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Pharmacol Ther.* **2006**;80:136-145.
37. Van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treatment Reviews.* **2009**;35:692-706.
38. Soucek P. Xenobiotics. Encyclopedia of Cancer, druhé vydání. New York, Springer-Verlag, **2008**. ISBN 978-3-540-47648-1.
39. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol.* **1998**;11:559-603.
40. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* **1999**;91:1194-1210.
41. Su T, Bao Z, Zhang QY, Smith TJ, Hong JY, Ding X. Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* **2000**;60:5074-5079.
42. Wang H, Tan W, Hao B, Miao X, Zhou G, He F, Lin D. Substantial reduction in risk of lung adenocarcinoma associated with genetic polymorphism in CYP2A13, the most active cytochrome P450 for the metabolic activation of tobacco-specific carcinogen NNK. *Cancer Res.* **2003**;63:8057-8061.
43. Cauffiez C, Lo-Guidice JM, Quaranta S, Allorge D, Chevalier D, Cenée S, Hamdan R, Lhermitte M, Lafitte JJ, Libersa C, Colombel JF, Stücker I, Broly F. Genetic polymorphism of the human cytochrome CYP2A13 in a French population: implication in lung cancer susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun.* **2004**;30:662-669.

- 44.Zhang X, Chen Y, Liu Y, Ren X, Zhang QY, Caggana M, Ding X. Single nucleotide polymorphisms of the human cyp2a13 gene: evidence for a null allele. *Drug Metab Dispos.* **2003**;31:1081-1085.
- 45.Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet.* **1994**;3:421-428.
- 46.Robien K, Boynton A, Ulrich CM. Pharmacogenetics of folate-related drug targets in cancer treatment. *Pharmacogenomics.* **2005**;6:673-689.
- 47.van der Logt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, Te Morsche RH, Dijk Y, Wobbes T, Nagengast FM, Peters WH. Role of epoxide hydrolase, NADP:H:quinone oxidoreductase, cytochrome P450 2E1 or alcohol dehydrogenase genotypes in susceptibility to colorectal cancer. *Mutat Res.* **2006**;593(1-2):39-49.
- 48.Haber PS, Apte MV, Applegate TL, Norton ID, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med.* **1998**;132:294-302.
- 49.Haber PS, Apte MV, Moran C, Applegate TL, Pirola RC, Korsten MA, McCaughan GW, Wilson JS. Nonoxidative metabolism of ethanol by rat pancreatic acini. *Pancreatology.* **2004**;4:82-89.
- 50.Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, Reyes CN, Kasho VN, Faller LD, Pandol SJ. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology.* **2002**;122:106-118.
- 51.Vonlaufen A, Wilson JS, Pirola RC, Apte MV. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Res Health.* **2007**;30:48-54.
- 52.Tolstrup JS, Nordestgaard BG, Rasmussen S, Tybjaerg-Hansen A, Grønbaek M.. Alcoholism and alcohol drinking habits predicted from alcohol dehydrogenase genes. *Pharmacogenomics J.* **2008**;8:220-227.
- 53.Matsuo K, Hiraki A, Hirose K, Ito H, Suzuki T, Wakai K, Tajima K. Impact of the alcohol-dehydrogenase (ADH)1C and ADH1B polymorphisms on drinking behavior in nonalcoholic Japanese. *Hum Mutat.* **2007**;28:506-510.
- 54.Yang SJ, Wang HY, Li XQ, Du HZ, Zheng CJ, Chen HG, Mu XY, Yang CX. Genetic polymorphisms of ADH2 and ALDH2 association with esophageal cancer risk in southwest China. *World J Gastroenterol.* **2007**;13:5760-5764.
- 55.Lee CH, Lee JM, Wu DC, Goan YG, Chou SH, Wu IC, Kao EL, Chan TF, Huang MC, Chen PS, Lee CY, Huang CT, Huang HL, Hu CY, Hung YH, Wu MT. Carcinogenetic impact of ADH1B and ALDH2 genes on squamous cell carcinoma risk of the esophagus with regard to the consumption of alcohol, tobacco and betel quid. *Int J Cancer.* **2008**;122:1347-1356.
- 56.Hiraki A, Matsuo K, Wakai K, Suzuki T, Hasegawa Y, Tajima K. Gene-gene and gene-environment interactions between alcohol drinking habit and polymorphisms in alcohol-

- metabolizing enzyme genes and the risk of head and neck cancer in Japan. *Cancer Sci.* **2007**;98:1087-91.
- 57.Solomon PR, Selvam GS, Shanmugam G. Polymorphism in ADH and MTHFR genes in oral squamous cell carcinoma of Indians. *Oral Dis.* **2008**;14:633-639.
- 58.Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem.* **1994**;224(3):893–899.
- 59.Jiao L, Bondy ML, Hassan MM, Chang DZ, Abbruzzese JL, Evans DB, Smolensky MH, Li D.. Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk and survival of pancreatic cancer. *Cancer.* **2007**;109:840–848.
- 60.Ferraz JM, Zinzindohoué F, Lecomte T, Cugnenc PH, Loriot MA, Beaune P, Stücker I, Berger A, Laurent-Puig P. Impact of GSTT1, GSTM1, GSTP1 and NAT2 genotypes on KRAS2 and TP53 gene mutations in colorectal cancer. *Int J Cancer.* **2004**;110(2):183-7.
- 61.Naccarati A, Soucek P, Stetina R, Haufroid V, Kumar R, Vodickova L, Trtkova K, Dusinska M, Hemminki K, Vodicka P.. Genetic polymorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: effects on DNA damage. *Mutat Res.* **2006**;593(1-2):22-31.
- 62.Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res.* **2009**;674:36-44.
- 63.Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res.* **2005**;569:101.
- 64.Hao J, Li G, Pang B. Evidence for cigarette smoke-induced oxidative stress in the rat pancreas. *Inhal Toxicol.* **2009**;21:1007-1012.
- 65.Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P.. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes.* **2005**;54:727-735.
- 66.Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* **1978**;201:875-880.
- 67.Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* **1996**;226:561-565.
- 68.Wang LI, Miller DP, Sai Y, Liu G, Su L, Wain JC, Lynch TJ, Christiani DC. Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* **2001**;93:1818-1821.
- 69.Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, Carta A, Hautefeuille A, Porru S. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental

- exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*. **2004**;25:973-978.
70. Bergman M, Ahnström M, Palmebäck Wegman P, Wingren S. Polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene and risk of breast cancer in young women. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2005**;131:439-444.
71. Woodson K, Tangrea JA, Lehman TA, Modali R, Taylor KM, Snyder K, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland). *Cancer Causes Control*. **2003**;14:513-518.
72. Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, Zhai R, Su L, Zhou W, Zhu A, Ryan DP, Christiani DC, Liu G. Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*. **2008**;112:1037-1042.
73. Siegel D, Anwar A, Winski SL, Kepa JK, Zolman KL, Ross D. Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol Pharmacol*. **2001**;59:263-268.
74. Jamieson D, Wilson K, Pridgeon S, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and nrh:quinone oxidoreductase 2 activity and expression in bladder and ovarian cancer and lower NRH:quinone oxidoreductase 2 activity associated with an NQO2 exon 3 single-nucleotide polymorphism. *Clin Cancer Res*. **2007**;13:1584-1590.
75. Lyn-Cook BD, Yan-Sanders Y, Moore S, Taylor S, Word B, Hammons GJ. Increased levels of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in pancreatic tissues from smokers and pancreatic adenocarcinomas: a potential biomarker of early damage in the pancreas. *Cell Biol Toxicol*. **2006**;22:73-80.
76. <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm> (accessed October 6, 2010)
77. Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*. **2008**;73(5):592-604.
78. Mack JT, Brown CB, Tew KD. ABCA2 as a therapeutic target in cancer and nervous system disorders. *Expert Opin Ther Targets*. **2008**;12(4):491-504.
79. Rabow AA, Shoemaker RH, Sausville EA, Covell DG. Mining the National Cancer Institute's tumor-screening database: identification of compounds with similar cellular activities. *J Med Chem*. **2002**;45(4):818-40.
80. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. **2002**;2(1):48-58.
81. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*. **2004**;75(1):13-33.
82. Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GI, Hubackova M, Kubala E, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Kristensen VN, Soucek P. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug

- resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. **2008**;18(3):263-73.
83. Takane H, Kobayashi D, Hirota T, Kigawa J, Terakawa N, Otsubo K, Ieiri I. Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene. *J Pharmacol Exp Ther*. **2004**;311(3):1179-1187.
84. Zhao YP, Zhang LY, Liao Q, Guo JC, Chen G, Li JY. Detection of multidrug resistant gene 1 in pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. **2004**;3(2):307-10.
85. Jensen PB, Holm B, Sorensen M, Christensen IJ, Sehested M. In vitro cross-resistance and collateral sensitivity in seven resistant small-cell lung cancer cell lines: preclinical identification of suitable drug partners to taxotere, taxol, topotecan and gemcitabine. *Br J Cancer*. **1997**;75:869-77.
86. Bergman AM, Pinedo HM, Talianidis I, Veerman G, Loves WJ, van der Wilt CL, Peters GJ. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br J Cancer*. **2003**;88(12):1963-70.
87. Suwa H, Ohshio G, Arao S, Imamura T, Yamaki K, Manabe T, Imamura M, Hiai H, Fukumoto M. Immunohistochemical localization of P-glycoprotein and expression of the multidrug resistance-1 gene in human pancreatic cancer: relevance to indicator of better prognosis. *Jpn J Cancer Res*. **1996**;87(6):641-9.
88. Lu Z, Kleeff J, Shrikhande S, Zimmermann T, Korc M, Friess H, Büchler MW. Expression of the multidrug-resistance 1 (MDR1) gene and prognosis in human pancreatic cancer. *Pancreas*. **2000**;21(3):240-7.
89. Annilo T, Dean M. Degeneration of an ATP-binding cassette transporter gene, ABCC13, in different mammalian lineages. *Genomics*. **2004**;84(1):34-46.
90. Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, Li Y. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Drug Metab*. **2008**;9(8):738-84.
91. Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, Fridland A. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med*. **1999**;5(9):1048-51.
92. Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2000**;97(13):7476-81.
93. Davidson JD, Ma L, Iverson PW, Lesoon A, Jin S, Horwitz L, Gallery M, Slapak CA. Human multi-drug resistance protein 5 (MRP5) confers resistance to gemcitabine. *Proc Am Assoc Cancer Res*. **2002**;43:3868.
94. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P.

- Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol.* **2003**;63(5):1094-103.
- 95.Oguri T, Achiwa H, Sato S, Bessho Y, Takano Y, Miyazaki M, Muramatsu H, Maeda H, Niimi T, Ueda R. The determinants of sensitivity and acquired resistance to gemcitabine differ in non-small cell lung cancer: a role of ABCC5 in gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther.* **2006**;5(7):1800-6.
- 96.Takayanagi S, Kataoka T, Ohara O, Oishi M, Kuo MT, Ishikawa T.Human ATP-binding cassette transporter ABCC10: expression profile and p53-dependent upregulation. *J Exp Ther Oncol.* **2004**;4(3):239-46.
- 97.Kruh GD, Guo Y, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Chen ZS. ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *Pflugers Arch.* **2007**;453(5):675-84
- 98.König J, Hartel M, Nies AT, Martignoni ME, Guo J, Büchler MW, Friess H, Keppler D. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer.* **2005**;115(3):359-67.
- 99.Wada M. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Lett.* **2006**;234(1):40-50.
- 100.de Wolf C, Jansen R, Yamaguchi H, de Haas M, van de Wetering K, Wijnholds J, Beijnen J, Borst P. Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides. *Mol Cancer Ther.* **2008**;7(9):3092-102.
- 101.Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F, Kalthoff H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* **2007**;6(1):92-7.
- 102.Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* **2004**;447:735-743.
- 103.Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.* **2004**;447(5):728-734.
- 104.Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, Crawford CR, Cass CE. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res.* **1998**;58(19):4349-4357.
- 105.García-Manteiga J, Molina-Arcas M, Casado FJ, Mazo A, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2,2-difluorodeoxycytidine-induced cytotoxicity. *Clin Can Res.* **2003**; 9(13):5000-5008.
- 106.Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, Dabbagh L, Young JD, Dumontet C, Cass C, Lai R, Mackey JR. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* **2004**;10(20):6956-6961.
- 107.Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V, Funel N, Nannizzi S, Ricci S, Orlandini C, Boggi U,

- Campani D, Del Chiaro M, Iannopollo M, Bevilacqua G, Mosca F, Danesi R. Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter- 1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Res.* **2006**;66(7):3928-3935.
108. Marchetti S, de Vries NA, Buckle T, Bolijn MJ, van Eijndhoven MA, Beijnen JH, Mazzanti R, van Tellingen O, Schellens JH. Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1^{-/-}/MDR1a/1b^{-/-} (triple-knockout) and wild-type mice. *Mol Cancer Ther.* **2008**;7(8):2280-7.
109. Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, Bates SE, Shen T, Ashby CR Jr, Fu LW, Ambudkar SV, Chen ZS. Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP- binding cassette subfamily B member 1 and ATP- binding cassette subfamily G member 2- mediated drug resistance. *Cancer Res.* **2007**;67(22):11012-20.
110. Kuang YH, Shen T, Chen X, Sodani K, Hopper-Borge E, Tiwari AK, Lee JW, Fu LW, Chen ZS. Lapatinib and erlotinib are potent reversal agents for MRP7 (ABCC10)-mediated multidrug resistance. *Biochem Pharmacol.* **2010**;79(2):154-61
111. Li J, Cusatis G, Brahmer J, Sparreboom A, Robey RW, Bates SE, Hidalgo M, Baker SD. Association of variant ABCG2 and the pharmacokinetics of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer patients. *Cancer Biol Ther.* **2007**;6(3):432-8.
112. Rudin CM, Liu W, Desai A, Karrison T, Jiang X, Janisch L, Das S, Ramirez J, Poonkuzhali B, Schuetz E, Fackenthal DL, Chen P, Armstrong DK, Brahmer JR, Fleming GF, Vokes EE, Carducci MA, Ratain MJ. Pharmacogenomic and pharmacokinetic determinants of erlotinib toxicity. *J Clin Oncol.* **2008**;26(7):1119-27..
113. Rosty C, Ueki T, Argani P, Jansen M, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol.* **2002**;160:45-50.
114. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* **2006**,19:1601-13.
115. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* **2009**;55(4):611-22.
116. Vilardell F, Iacobuzio-Donahue CA. Cancer gene profiling in pancreatic cancer. *Methods Mol Biol.* **2010**;576:279-92.
117. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* **1999**;259(3):523-6.

118. Mane VP, Heuer MA, Hillyer P, Navarro MB, Rabin RL. Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis. *J Biomol Tech.* **2008**;19(5):342-7.
119. Blanquicett C, Johnson MR, Heslin M, Diasio RB. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies. *Anal Biochem.* **2002**;303(2):209-14.
120. Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, Brittner B, Ludwig B, Schilling M. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes.* **2005**;19(2):101-9.
121. Sugimura H, Caporaso NE, Shaw GL, Modali RV, Gonzalez FJ, Hoover RN, Resau JH, Trump BF, Weston A, Harris CC. Human debrisoquine hydroxylase gene polymorphisms in cancer patients and controls. *Carcinogenesis.* **1990**;11:1527-1530.
122. Bustin SA, Nolan T. Template handling, preparation, and purification. The Real-Time PCR Encyclopedia A-Z of Quantitative real-time PCR. Vydáno Univerzitou v Line, La Jolla, CA, pp 87-120, **2004**. ISBN: 0-9636817-8-8.
123. Pfaffl MW. Nucleic acids: mRNA identification and quantification. Nucleic Acids, Encyclopedia of Analytical Science, druhé vydání. Academic Press, pp 417-426, **2005**. ISBN: 978-0-12-369397-6.
124. Kleibl Z, Havranek O, Novotny J, Kleiblova P, Soucek P, Pohlreich P. Analysis of CHEK2 FHA domain in Czech patients with sporadic breast cancer revealed distinct rare genetic alterations. *Breast Cancer Res Treat.* **2008**;112(1):159-64.
125. Kleibl Z, Havranek O, Hlavata I, Novotny J, Sevcik J, Pohlreich P, Soucek P. The CHEK2 gene I157T mutation and other alterations in its proximity increase the risk of sporadic colorectal cancer in the Czech population. *Eur J Cancer.* **2009**;45(4):618-24.
126. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**;3(7):research0034.
127. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* **2004**;64 5245-5250.
128. Sarmanova J, Susova S, Gut I, Mrhalová M, Kodet R, Adámek J, Roth Z, Soucek P. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet.* **2004**;12:848-854.
129. Zatonski WA, Boyle P, Przewozniak K, Maisonneuve P, Drosik K, Walker AM. Cigarette smoking, alcohol, tea and coffee consumption and pancreas cancer risk: a case-control study from Opole, Poland. *Int J Cancer.* **1993**;53:601-607.
130. Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi A, Yagyu K, Obata Y, Kurosawa M, Inaba Y, Kawamura T,

- Motohashi Y, Ishibashi T. Green tea consumption and the risk of pancreatic cancer in Japanese adults. *Pancreas*. **2008**;37:25-30.
131. Wang H, Tan W, Hao B, Miao X, Zhou G, He F, Lin D. Substantial reduction in risk of lung adenocarcinoma associated with genetic polymorphism in CYP2A13, the most active cytochrome P450 for the metabolic activation of tobacco-specific carcinogen NNK. *Cancer Res*. **2003**;63:8057-8061.
132. Schlicht KE, Michno N, Smith BD, Scott EE, Murphy SE. Functional characterization of CYP2A13 polymorphisms. *Xenobiotica*. **2007**;37:1439-1449.
133. Chrostek L, Jelski W, Szmitkowski M, Puchalski Z. Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the human pancreas. *Dig Dis Sci*. **2003**;48:1230-1233.
134. Jelski W, Chrostek L, Szmitkowski M. The activity of class I, II, III, and IV of alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in pancreatic cancer. *Pancreas*. **2007**;35:142-146.
135. Tolstrup JS, Nordestgaard BG, Rasmussen S, Tybjaerg-Hansen A, Grønbaek M. Alcoholism and alcohol drinking habits predicted from alcohol dehydrogenase genes. *Pharmacogenomics J*. **2008**;8:220-227.
136. Matsuo K, Hiraki A, Hirose K, Ito H, Suzuki T, Wakai K, Tajima K. Impact of the alcohol-dehydrogenase (ADH)1C and ADH1B polymorphisms on drinking behavior in nonalcoholic Japanese. *Hum Mutat*. **2007**;28:506-510.
137. Jiao L, Silverman DT, Schairer C, Thiébaud AC, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, Stolzenberg-Solomon RZ. Alcohol use and risk of pancreatic cancer: the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Epidemiol*. **2009**;169:1043-1051.
138. Rohrmann S, Linseisen J, Vrieling A, Boffetta P, Stolzenberg-Solomon RZ, Lowenfels AB, Jensen MK, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Fagherazzi G, Misirli G, Lagiou P, Trichopoulou A, Kaaks R, Bergmann MM, Boeing H, Bingham S, Khaw KT, Allen N, Roddam A, Palli D, Pala V, Panico S, Tumino R, Vineis P, Peeters PH, Hjartåker A, Lund E, Redondo Cornejo ML, Agudo A, Arriola L, Sánchez MJ, Tormo MJ, Barricarte Gurrea A, Lindkvist B, Manjer J, Johansson I, Ye W, Slimani N, Duell EJ, Jenab M, Michaud DS, Mouw T, Riboli E, Bueno-de-Mesquita HB. Ethanol intake and the risk of pancreatic cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control*. **2009**;20:785-794.
139. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bergkvist L, Bernstein L, van den Brandt PA, English DR, Freudenheim JL, Fuchs CS, Giles GG, Giovannucci E, Hankinson SE, Horn-Ross PL, Leitzmann M, Männistö S, Marshall JR, McCullough ML, Miller AB, Reding DJ, Robien K, Rohan TE, Schatzkin A, Stevens VL, Stolzenberg-Solomon RZ, Verhage BA, Wolk A, Ziegler RG,

- Smith-Warner SA. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2009**;18:765-776.
140. Carlsten C, Sagoo GS, Frodsham AJ, Burke W, Higgins JP. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* **2008**;167:759-774.
141. Liu G, Ghadirian P, Vesprini D, Hamel N, Paradis AJ, Lal G, Gallinger S, Narod SA, Foulkes WD. Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 and risk of pancreatic adenocarcinoma, *Br J Cancer.* **2000**;82:1646-1649.
142. Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT. A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *J Natl Cancer Inst.* **2002**;94:297-306.
143. Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett.* **2009**;282:125-136.
144. Wittel UA, Pandey KK, Andrianifahanana M, Johansson SL, Cullen DM, Akhter MP, Brand RE, Prokoczyk B, Batra SK. Chronic pancreatic inflammation induced by environmental tobacco smoke inhalation in rats. *Am J Gastroenterol.* **2006**;101:148-159.
145. Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Peters U, Reding D, Chatterjee N, Welch R, Chanock S, Huang WY, Hayes RB. Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2007**;16:1581-1586.
146. Vineis P, Veglia F, Garte S, Malaveille C, Matullo G, Dunning A, Peluso M, Airolidi L, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Clavel-Chapelon F, Linseisen JP, Kaaks R, Boeing H, Trichopoulou A, Palli D, Crosignani P, Tumino R, Panico S, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Gonzalez CA, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Quiros JR, Berglund G, Jarvholm B, Day NE, Key TJ, Saracci R, Riboli E, Autrup H. Genetic susceptibility according to three metabolic pathways in cancers of the lung and bladder and in myeloid leukemias in nonsmokers. *Ann Oncol.* **2007**;18:1230-1242.
147. Cullen JJ, Mitros FA, Oberley LW. Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas.* **2003**;26:23-27.
148. Cullen JJ, Hinkhouse MM, Grady M, Gaut AW, Liu J, Zhang YP, Weydert CJ, Domann FE, Oberley LW. Dicumarol inhibition of NADPH:quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism. *Cancer Res.* **2003**;63:5513-5520.
149. Bartsch DK, Krysewski K, Sina-Frey M, Fendrich V, Rieder H, Langer P, Kress R, Schneider M, Hahn SA, Slater EP. Low frequency of CHEK2 mutations in familial pancreatic cancer. *Fam Cancer.* **2006**;5:305-8.

- 150.Miyasaka Y, Nagai E, Yamaguchi H, Fujii K, Inoue T, Ohuchida K, Yamada T, Mizumoto K, Tanaka M, Tsuneyoshi M. The role of the DNA damage checkpoint pathway in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Clin Cancer Res.* **2007**;13:4371-7.
- 151.Suchy J, Cybulski C, Wokolorczyk D, Oszurek O, Górski B, Debniak T, Jakubowska A, Gronwald J, Huzarski T, Byrski T, Dziuba I, Gogacz M, Wiśniowski R, Wandzel P, Banaszkiwicz Z, Kurzawski G, Kładny J, Narod SA, Lubiński J. CHEK2 mutations and HNPCC - related colorectal cancer. *Int J Cancer.* **2010**;126(12):3005-9.
- 152.Begleiter A, Hewitt D, Maksymiuk AW, Ross DA, Bird RP. A NADP:H:quinone oxidoreductase 1 polymorphism is a risk factor for human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2006**;15:2422-2426.
- 153.Mitrou PN, Watson MA, Loktionov AS, Cardwell C, Gunter MJ, Atkin WS, Macklin CP, Cecil T, Bishop DT, Primrose J, Bingham SA. Role of NQO1C609T and EPHX1 gene polymorphisms in the association of smoking and alcohol with sporadic distal colorectal adenomas: results from the UKFSS Study. *Carcinogenesis.* **2007**;28:875-882.
- 154.Vrana D, Pikhart H, Mohelnikova-Duchonova B, Holcatova I, Strnad R, Slamova A, Schejbalova M, Ryska M, Susova S, Soucek P. The association between Glutathione S-transferase Gene polymorphisms and pancreatic cancer in central European Slavonic population. *Mutat Res.* **2009**;680:78-81
- 155.Dofkova M, Kopriva V, Resova D, Rehurkova I and Ruprich J. The development of food consumption in the Czech Republic after 1989. *Public Health Nutr.* 2001;4: 999-1003.
- 156.Heath SC, Gut IG, Brennan P, McKay JD, Bencko V, Fabianova E, Foretova L, Georges M, Janout V, Kabesch M, Krokan HE, Elvestad MB, Lissowska J, Mates D, Rudnai P, Skorpén F, Schreiber S, Soria JM, Syvänen AC, Meneton P, Herçberg S, Galan P, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Génin E, Cardon LR, Lathrop M. Investigation of the fine structure of European populations with applications to disease association studies. *Eur J Hum Genet.* **2008**;16:1413-1429.
- 157.McFadden E, Luben R, Wareham N, Bingham S, Khaw KT. Occupational social class, educational level, smoking and body mass index, and cause-specific mortality in men and women: a prospective study in the European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition in Norfolk (EPIC-Norfolk) cohort. *Eur J Epidemiol.* **2008**;23:511-522.
- 158.Zejglicova K, Kratenova J, Maly M, Kubinova R. Incidence of risk factors of chronic non-infectious diseases including socio-economic factors in the urban middle age population in the Czech Republic-results of HELEN study. *Cas Lek Cesk.* **2006**;145:936-942.
- 159.Singh H, Turner D, Xue L, Targownik LE, Bernstein CN. Risk of developing colorectal cancer following a negative colonoscopy examination: evidence for a 10-year interval between colonoscopies. *JAMA.* **2006**;295:2366-2373.
- 160.Sachse C, Smith G, Wilkie MJ, Barrett JH, Waxman R, Sullivan F, Forman D, Bishop DT, Wolf

- CR. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. **2002**;23:1839-1849.
161. Chao C, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P, Hashibe M. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1 Pro187Ser polymorphism and the risk of lung, bladder, and colorectal cancers: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2006**;15:979-987.
162. Camdeviren H. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet*. **2005**;43:149-163.
163. Yoshioka M, Katoh T, Nakano M, Takasawa S, Nagata N, Itoh H. Glutathione S-transferase (GST) M1, T1, P1, N-acetyltransferase (NAT) 1 and 2 genetic polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer. *J UOEH*. **1999**;21:133-147.
164. Ye Z, Parry JM. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to colon cancer. *Teratog Carcinog Mutagen*. **2002**;22:385-392.
165. Little J, Sharp L, Masson LF, Brockton NT, Cotton SC, Haites NE, Cassidy J. Colorectal cancer and genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1: a case-control study in the Grampian region of Scotland. *Int J Cancer*. **2006**;119:2155-2164.
166. Hoensch H, Peters WH, Roelofs HM, Kirch W. Expression of the glutathione enzyme system of human colon mucosa by localisation, gender and age. *Curr Med Res Opin*. **2006**;22:1075-1083.
167. Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, Lenz HJ. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. **2002**;94:936-942.
168. Huang K, Sandler RS, Millikan RC, Schroeder JC, North KE, Hu J. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, cigarette smoking, and risk of colon cancer: a population-based case-control study in North Carolina (United States). *Cancer Causes Control*. **2006**;17:385-394.
169. Moore LE, Huang WY, Chatterjee N, Gunter M, Chanock S, Yeager M, Welch B, Pinsky P, Weissfeld J, Hayes RB. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2005**;14:1823-1827.
170. Gao Y, Cao Y, Tan A, Liao C, Mo Z, Gao F. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and sporadic colorectal cancer risk: an updating meta-analysis and HuGE review of 36 case-control studies. *Ann Epidemiol*. **2010**;20:108-121.
171. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*. **2006**;27:126-139.
172. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M, Fleischmann A, Altermatt HJ, Jaggi R. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest*. **2005**;85:1040-1050.
173. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-deltaCt methods. *Methods*. **2001**;25:402-408.

174. Ellinger S, Müller N, Stehle P, Ulrich-Merzenich G. Consumption of green tea or green tea products: Is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies? *Phytomedicine*. **2011**;18(11):903-15.
175. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P, King MC. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA*. **2006**;295(12):1379-88.
176. Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P, Berberich R, Grünewald K, Haun M, Kraft HG. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer*. **2004**;90(10):1989-94.
177. Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*. **2007**;59(12):752-7.
178. Guo Y, Kotova E, Chen ZS, Lee K, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Kruh GD. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem*. **2003**;278(32):29509-14.
179. Nambaru PK, Hübner T, Köck K, Mews S, Grube M, Payen L, Guitton J, Sendler M, Jedlitschky G, Rimbach C, Roskopf D, Kowalczyk DW, Kroemer HK, Weiss FU, Mayerle J, Lerch MM, Ritter CA. Drug efflux transporter multidrug resistance-associated protein 5 affects sensitivity of pancreatic cancer cell lines to the nucleoside anticancer drug 5-fluorouracil. *Drug Metab Dispos*. **2011**;39(1):132-9.
180. Oude Elferink RP, Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch*. **2007**;453(5):601-10.
181. Fein F, Hermelin B, Becker MC, Felix S, Carbonnel F. Acute recurrent biliary pancreatitis associated with the ABCB4 gene mutation. *Gastroenterol Clin Biol*. **2007**;31(1):106-9.
182. Duan Z, Brakora KA, Seiden MV. Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther*. **2004**;3(7):833-8.
183. Turton NJ, Judah DJ, Riley J, Davies R, Lipson D, Styles JA, Smith AG, Gant TW. Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance. *Oncogene*. **2001**;20(11):1300-6.
184. Chen HL, Gabilovich D, Tampé R, Girgis KR, Nadaf S, Carbone DP. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet*. **1996**;13(2):210-3.
185. Kasajima A, Sers C, Sasano H, Jöhrens K, Stenzinger A, Noske A, Buckendahl AC, Darb-Esfahani S, Müller BM, Budczies J, Lehman A, Dietel M, Denkert C, Weichert W. Down-

- regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer. *Hum Pathol.* **2010**;41:1758-69.
186. Leibowitz MS, Andrade Filho PA, Ferrone S, Ferris RL. Deficiency of activated STAT1 in head and neck cancer cells mediates TAP1-dependent escape from cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother.* **2011**;60(4):525-35.
187. Ramnath N, Tan D, Li Q, Hylander BL, Bogner P, Ryes L, Ferrone S. Is down-regulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival. *Cancer Immunol Immunother.* **2006**;55:891-899.
188. Han LY, Fletcher MS, Urbauer DL, Mueller P, Landen CN, Kamat AA, Lin YG, Merritt WM, Spannuth WA, Deavers MT, De Geest K, Gershenson DM, Lutgendorf SK, Ferrone S, Sood AK. HLA class I antigen processing machinery component expression and intratumoral T-cell infiltrate as independent prognostic markers in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* **2008**;14:3372-3379.
189. Ayshamgul H, Ma H, Ilyar S, Zhang LW, Abulizi A. Association of defective HLA-I expression with antigen processing machinery and their association with clinicopathological characteristics in Kazak patients with esophageal cancer. *Chin Med J (Engl).* **2011**;124(3):341-6.
190. Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta.* **2006**;1762:510-24.
191. Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med.* **2004**;350:1296-1303.
192. Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB, de Jong PT. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet.* **2000**;25(2):228-31.
193. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* **1989**;245(4922):1066-73.
194. Naren AP, Quick MW, Collawn JF, Nelson DJ, Kirk KL. Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc Natl Sci USA.* **1998**;95:10972-10977.
195. Hanrahan JW, Mathews CJ, Grygorczyk R, Tabcharani JA, Grzelczak Z, Chang XB, Riordan JR. Regulation of the CFTR chloride channel from human and sharks. *J Exp Zool.* **1996**;275:283-291.
196. Weixel KM, Bradbury NA. The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J Biol Chem.* **2000**;275:3655-3660.

8. SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Plný název
18S	Gen 18S (<u>18S</u> ribosomal RNA)
95% CI	95% konfidenční interval (<u>C</u> onfidence <u>I</u> nterval)
5-FU	<u>5</u> - <u>F</u> luorouracil (cytostatikum)
A	<u>A</u> denin (6-aminopurin; purinová báze)
ABC transportéry	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette transporters
ABCA1	ABC transportér- člen 1 podrodiny ABCA
ABCA10	ABC transportér- člen 10 podrodiny ABCA
ABCA11	ABC transportér- člen 11 podrodiny ABCA
ABCA12	ABC transportér- člen 12 podrodiny ABCA
ABCA13	ABC transportér- člen 13 podrodiny ABCA
ABCA2	ABC transportér- člen 2 podrodiny ABCA
ABCA3	ABC transportér- člen 3 podrodiny ABCA
ABCA4	ABC transportér- člen 4 podrodiny ABCA
ABCA5	ABC transportér- člen 5 podrodiny ABCA
ABCA6	ABC transportér- člen 6 podrodiny ABCA
ABCA7	ABC transportér- člen 7 podrodiny ABCA
ABCA8	ABC transportér- člen 8 podrodiny ABCA
ABCA9	ABC transportér- člen 9 podrodiny ABCA
ABCB1	ABC transportér- člen 1 podrodiny ABCB
ABCB10	ABC transportér- člen 10 podrodiny ABCB
ABCB11	ABC transportér- člen 11 podrodiny ABCB
ABCB2	ABC transportér- člen 2 podrodiny ABCB
ABCB3	ABC transportér- člen 3 podrodiny ABCB
ABCB4	ABC transportér- člen 4 podrodiny ABCB
ABCB5	ABC transportér- člen 5 podrodiny ABCB
ABCB6	ABC transportér- člen 6 podrodiny ABCB
ABCB7	ABC transportér- člen 7 podrodiny ABCB
ABCB8	ABC transportér- člen 8 podrodiny ABCB
ABCB9	ABC transportér- člen 9 podrodiny ABCB
ABCC1	ABC transportér- člen 1 podrodiny ABCC
ABCC10	ABC transportér- člen 10 podrodiny ABCC
ABCC11	ABC transportér- člen 11 podrodiny ABCC
ABCC12	ABC transportér- člen 12 podrodiny ABCC
ABCC13	ABC transportér- člen 13 podrodiny ABCC
ABCC2	ABC transportér- člen 2 podrodiny ABCC
ABCC3	ABC transportér- člen 3 podrodiny ABCC
ABCC4	ABC transportér- člen 4 podrodiny ABCC
ABCC5	ABC transportér- člen 5 podrodiny ABCC
ABCC6	ABC transportér- člen 6 podrodiny ABCC
ABCC7	ABC transportér- člen 7 podrodiny ABCC
ABCC8	ABC transportér- člen 8 podrodiny ABCC

ABCC9	ABC transportér- člen 9 podrodiny ABCC
ABCD1	ABC transportér- člen 1 podrodiny ABCD
ABCD2	ABC transportér- člen 2 podrodiny ABCD
ABCD3	ABC transportér- člen 3 podrodiny ABCD
ABCD4	ABC transportér- člen 4 podrodiny ABCD
ABCE1	ABC transportér- člen 1 podrodiny ABCE
ABCF1	ABC transportér- člen 1 podrodiny ABCF
ABCF2	ABC transportér- člen 2 podrodiny ABCF
ABCF3	ABC transportér- člen 3 podrodiny ABCF
ABCG1	ABC transportér- člen 1 podrodiny ABCG
ABCG2	ABC transportér- člen 2 podrodiny ABCG
ABCG3	ABC transportér- člen 3 podrodiny ABCG
ABCG4	ABC transportér- člen 4 podrodiny ABCG
ABCG5	ABC transportér- člen 5 podrodiny ABCG
ABCG8	ABC transportér- člen 8 podrodiny ABCG
ABL1	Gen ABL1 (<u>A</u> belson murine <u>L</u> eukemia viral oncogene, homolog 1)
ACTB	Gen ACTB (<u>A</u> ctin- <u>B</u> eta)
ADH	<u>A</u> lcohol <u>d</u> ehydrogenáza
ADH1B	Gen ADH1B (<u>A</u> lcohol <u>d</u> ehydrogenase, class <u>1</u> , <u>b</u> eta polypeptide)
ADH1C	Gen ADH1C (<u>A</u> lcohol <u>d</u> ehydrogenase, class <u>1</u> , <u>g</u> amma polypeptide)
AKR	<u>A</u> ldo- <u>K</u> eto <u>R</u> eduktáza
Ala	<u>A</u> lanin (α -aminopropanová kyselina)
ALDH	<u>A</u> ldehyd <u>d</u> ehydrogenáza
ALR	Gen ALR (<u>A</u> ugmenter of <u>L</u> iver <u>R</u> egeneration, synonymum je gen GFER-growth factor, ERV1- like)
APC	Gen APC (<u>A</u> denomatous <u>P</u> olyposis <u>C</u> oli)
APM	<u>A</u> ntigen <u>p</u> rocessing <u>m</u> achinery
Arg	Arginin (2-amino-5-guanidinopentanová kyselina)
ATP	Adenosintrifosfát (<u>A</u> denosine-5'- <u>t</u> riphosphate)
B2M (567)	Gen B2M (<u>B</u> eta- <u>2</u> <u>M</u> icroglobuline)
BCRP	Protein BCRP (<u>B</u> reast <u>C</u> ancer <u>R</u> esistance <u>P</u> rotein), produkt genu ABCG2
BMI	<u>B</u> ody <u>M</u> ass <u>I</u> ndex- poměr hmotnosti osob (kg) a druhé mocniny jejich výšky (m)
bp	<u>b</u> ase <u>p</u> airs- počet párů bazí označující velikost DNA fragmentu
BRCA1/2	Gen BRCA1/2 (<u>B</u> reast <u>C</u> ancer gene <u>1</u> , <u>B</u> reast <u>C</u> ancer gene <u>2</u>)
C	<u>C</u> ytosin (2-oxo-4-aminopyridin; pyrimidinová báze)
CBR	Karbonyl reduktáza (<u>c</u> arbonyl <u>r</u> eductase)
CDA	Cytidin deamináza (<u>C</u> ytidine <u>d</u> eaminase)
CDKN2A	Gen CDKN2 (<u>C</u> yclin- <u>D</u> ependent <u>K</u> inase inhibitor <u>2A</u>)
cDNA	Komplementární DNA (<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA)

CE	Karboxyl esteráza (<u>C</u> arboxyl <u>e</u> sterase)
CPR	Cytochrom <u>P</u> 450 reduktáza
CR	Karbonyl reduktáza (<u>C</u> arboxyl <u>r</u> eductase)
CRC	Rakovina tlustého střeva a konečníku (<u>C</u> olorectal <u>C</u> ancer)
Ct	Cycle treshold- cyklus kvantitativní PCR reakce, kdy fluorescence stanovovaného genu překročí daný práh
CT	Počítačová tomografie (<u>c</u> omputed <u>t</u> omography)
CTL	Cytotoxické <u>T</u> Lymfocyty
CYP	Cytochrom <u>P</u> 450
CYP1A1	CYP- člen 1 podrodiny CYP1A
CYP1A2	CYP- člen 2 podrodiny CYP1A
CYP1B1	CYP- člen 1 podrodiny CYP1B
CYP2A13	CYP- člen 13 podrodiny CYP2A
CYP2C8	CYP- člen 8 podrodiny CYP2C
CYP2D6	CYP- člen 6 podrodiny CYP2D
CYP3A4	CYP- člen 4 podrodiny CYP3A
CYP3A5	CYP- člen 5 podrodiny CYP3A
DCK	Gen DCK (Deoxycitidinekinase)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid)
dNTP	<u>D</u> eoxyribo <u>N</u> ucleoside <u>t</u> riphosphate- stavební jednotky při syntéze DNA
E	Účinnost PCR reakce (<u>E</u> fficiency)
EC	<u>E</u> nzyme <u>C</u> ommission number (EC number) – číselné schéma klasifikace enzymů dle reakcí, které katalyzují
EDTA	disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (<u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> cetic <u>A</u> cid)
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor (<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor)
EIF2B1	Gen EIF2B1 (<u>E</u> karyotic translation <u>I</u> nitiation <u>F</u> actor <u>2</u> <u>B</u> , podjednotka 1)
ELF1	Gen ELF1 (<u>E</u> 74- <u>L</u> ike <u>F</u> actor <u>1</u>)
EPHX1	Gen EPHX1 (<u>E</u> po <u>x</u> ide <u>h</u> ydrolase <u>1</u>)
ERCP	<u>E</u> ndoskopická <u>r</u> etrográdní <u>ch</u> olangiopankreatografie
FHA	<u>F</u> ork <u>H</u> ead- <u>A</u> ssociated domain
FMO	<u>F</u> lavin obsahující <u>M</u> ono <u>o</u> xygenáza
FRET	<u>F</u> luorescence <u>R</u> esonance <u>E</u> nergy <u>T</u> ransfer- mechanismus popisující energetický přenos mezi dvěma chromofory
G	Guanin (2-amino-6-hydroxypurin; purinová báze)
GADD45A	Gen GADD45A (<u>G</u> rowth <u>A</u> rrest and <u>D</u> N <u>A</u> <u>D</u> amage <u>I</u> nducible gene, <u>A</u> lpha)
GAPDH	Gen GAPDH (<u>G</u> lyceraldehyde-3-phosphate <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase)
GSTM1	Glutation-S-transferáza M1 (<u>G</u> lutathione <u>S</u> -transferase, class <u>M</u> <u>U</u> -1)
GSTP1	Glutation-S-transferáza P1 (<u>G</u> lutathione <u>S</u> -transferase, class <u>P</u> <u>I</u>)
GSTT1	Glutation-S-transferáza T1 (<u>G</u> lutathione <u>S</u> -transferase, <u>t</u> heta- <u>1</u>)

GUSB	Gen GUSB (<u>B</u> eta- <u>g</u> lucuronidase)
hCNT	Nukleosidové transportéry (<u>h</u> uman <u>C</u> oncentrative <u>N</u> ucleoside <u>T</u> ransporter, rodina SLC28)
hENT	Nukleosidové transportéry (<u>h</u> uman <u>E</u> quilibrative <u>N</u> ucleoside <u>T</u> ransporter, rodina SLC29)
His	<u>H</u> istidin (kyselina 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanová)
HLA I	Hlavní histokompatibilní komplex 1. třídy (<u>H</u> uman <u>L</u> eucocy <u>A</u> ntigen)
HMBS	Gen HMBS (<u>H</u> ydroxymethylbilane <u>S</u> ynthase)
HPRT1	Gen HPRT1 (<u>H</u> ypoxantjine <u>G</u> uanine <u>P</u> hosphoribosyltransferase <u>1</u>)
CHEK2	Gen CHEK2 (<u>C</u> heckpoint <u>K</u> inase <u>2</u>)
i.v.	Intravenous- podání preparátu do žíly
IHC	<u>I</u> munohistochemie
Ile	<u>I</u> soleucin ((2S,3S)-2-amino-3-methylpentanová kyselina)
IPO8	Gen IPO8 (<u>I</u> mportin <u>8</u>)
K	Draslík (<u>K</u> alium)
kp	<u>K</u> ilo base pairs, odpovídá 1 000 bp
KRAS	Gen KRAS (<u>V</u> - <u>K</u> i-ras2 <u>K</u> irsten <u>R</u> at <u>S</u> arcoma viral oncogene homolog)
Leu	<u>L</u> euцин (2-amino-4-methylpentanová kyselina)
LRP	Gen LRP (<u>L</u> ung <u>R</u> esistance-related protein, synonymum Major Vault protein, MVP)
MAO	Gen MAO (<u>M</u> onoamine <u>O</u> xidase)
MAPK	Gen MAPK (<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase)
MDR	Mnohočetná léková rezistence (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance)
MDR1	Gen MDR1 (<u>M</u> ultidrug resistance <u>1</u> , synonymum ABCB1)
MgCl2	Chlorid hořečnatý
MQ	<u>M</u> ili <u>Q</u> - destilovaná sterilizovaná voda
MR	<u>M</u> agnetická <u>R</u> esonance
mRNA	Informační RNA (<u>M</u> essenger <u>R</u> NA) - ribonukleová kyselina nesoucí informaci pro syntézu polypeptidů
MRP	<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistant <u>P</u> rotein
MRP1	Gen MRP1 (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Associated <u>P</u> rotein <u>1</u> , Synonymum ABCC1)
MRP2	Gen MRP2 (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Associated <u>P</u> rotein <u>2</u> , Synonymum ABCC2)
MRP3	Gen MRP3 (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Associated <u>P</u> rotein <u>3</u> , Synonymum ABCC3)
MRP4	Gen MRP4 (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Associated <u>P</u> rotein <u>4</u> , Synonymum ABCC4)
MRP5	Gen MRP5 (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Associated <u>P</u> rotein <u>5</u> , Synonymum ABCC5)
MRP6	Gen MRP6 (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Associated <u>P</u> rotein <u>6</u> , Synonymum ABCC6)
MRP7	Gen MRP7 (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Associated <u>P</u> rotein <u>7</u> , Synonymum ABCC10)
MRP8	Gen MRP8 (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Associated <u>P</u> rotein <u>8</u> ,

	Synonymum ABCC11)
MRP9	Gen MRP9 (<u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance-Associated <u>P</u> rotein <u>9</u> , Synonymum ABCC12)
MRPL19	Gen MRPL19 (<u>M</u> itochondrial <u>R</u> ibosomal <u>P</u> rotein <u>L</u> 19)
MVP	Viz. LRP
NaCl	Chlorid sodný
NADPH	Redukovaná forma Nikotinamidu adeninu dinucleotidfosfátu (<u>N</u> icotinamide <u>A</u> denine <u>D</u> inucleotide <u>P</u> hosphate)
NAT	<u>N</u> - <u>a</u> cetyl <u>t</u> ransferáza
NBD	Doména vážící nukleotidy (<u>N</u> ucleotide <u>B</u> inding <u>D</u> omain)
NF-kB	Gen NF-kB (<u>N</u> uclear <u>F</u> actor <u>k</u> appa- <u>B</u>)
NNK	Nitrosamin 4-(methylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1- butanon
NQO	NAD(P)H:chinon dehydrogenáza
NQO1	Gen NQO1 (<u>N</u> ADPH <u>Q</u> uinone <u>O</u> xidoreductase <u>1</u>)
NQO2	Gen NQO2 (<u>N</u> ADPH <u>Q</u> uinone <u>O</u> xidoreductase <u>2</u>)
NTC	<u>N</u> o <u>T</u> emplate <u>C</u> ontrol- vzorek obsahující vodu místo templát nukleotidové kyseliny, negativní kontrola PCR
OMIM	<u>O</u> nline <u>M</u> endelian <u>I</u> nheritance in <u>M</u> an-databáze všech známých onemocnění spolu s jejich genetickými komponentami
OR	<u>O</u> dds <u>R</u> atio- angl. poměr dvou odds, neboli podílů pravděpodobností. Je mírou relativního rizika.
p	p-value- udává jaké chyby se dopouštíme, pokud zamítneme nulovou hypotézu
P 450	Cytochrom <u>P</u> 450
PanC	Rakovina slinivky břišní (<u>P</u> ancreatic <u>C</u> ancer)
PCR	Polymérazová řetězová reakce (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PES1	Gen PES1 (human homolog <u>1</u> of zebrafish <u>P</u> escadilo gene)
PGK1	Gen PGK1 (<u>P</u> hosphoglycerate <u>K</u> inase- <u>1</u>)
pH	potential of hydrogen- vodíkový exponent je záporně vzat dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů, Vyjadřuje, zda roztok reaguje kyselě, či zásaditě.
Phe	Fenylalanin ((2S)-2-amino-3-fenylpropanová kyselina)
PI3K	<u>P</u> hosphatidyl <u>I</u> nositol <u>3</u> - <u>K</u> inase
PMM1	Gen PMM1 (<u>P</u> hosphom <u>a</u> nnom <u>u</u> tase <u>1</u>)
POLR2A	Gen POLR2A (DNA-dependent <u>R</u> NA <u>P</u> olymerase <u>II</u> , subunit <u>A</u>)
POLR2L	Gen POLR2A (DNA-dependent <u>R</u> NA <u>P</u> olymerase <u>II</u> , subunit <u>L</u>)
PON	Gen PON1-3 (<u>P</u> araoxonase 1-3)
POP4	Gen POP4 (<u>P</u> rocessing <u>O</u> f <u>P</u> recursor 4, synonymum Ribonuclease P/MRP, podjednotka 29kD; RPP29)
POR	Gen POR (Cytochrom <u>P</u> 450 <u>O</u> xidoreductase)
PPIA	Gen PPIA (<u>P</u> eptidyl- <u>P</u> rolyl <u>I</u> somerase <u>A</u> , synonymum Cyclophilin A)
Pro	Prolin ((2S)-Pyrrolidin-2-karboxylová kyselina, (2S)-

	Azacyklopentan-2-karboxylová kyselina)
PSMC4	Gen PSMC4 (Proteasome 26S Subunit, ATPase, 4)
Q	Relativní kvantita (Relative <u>Q</u> uantity)
QARS	Gen QUARS kóduje Glutaminyl-tRNA Syntetázu
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time polymerase chain reaction, také <u>Q</u> uantitative real time polymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction; Q-PCR/qPCR/qrt-PCR) je metoda založena na principu klasické PCR, umožňuje však kvantifikaci sledovaného úseku DNA.
R ²	Determinační koeficient užívaný v regresních modelech
RAL-GTP	Ras-related protein
RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism)
RIN	Koeficient vyjadřující míru integrity RNA (<u>R</u> NA <u>I</u> ntegrity <u>N</u> umber)
RNA	Ribonukleová kyselina (<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid)
RPL30	Gen RPL30 (<u>R</u> ibosomal <u>P</u> rotein <u>L</u> 30)
RPS17	Gen RPS17 (<u>R</u> ibosomal <u>P</u> rotein <u>S</u> 17)
rs	Referenční číslo polymorfismu (reference <u>S</u> NP ID number) v databázi (Single Nucleotide Polymorphism Database- dbSNP) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP
RT-PCR	Reverzně-transkripční polymerázová řetězová reakce (<u>R</u> everse <u>T</u> ranscription <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
S.D.	<u>S</u> tandard <u>D</u> eviation- ang. směrodatná odchylka
SCLC	<u>S</u> mall <u>C</u> ell <u>C</u> arcinoma of <u>L</u> ung- ang. malobuněčný karcinoma plic
SDS	Dodecylsírán sodný (<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
Ser	Serin ((2S)-2-amino-3-hydroxypropanová kyselina)
siRNA	- angl. <u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA, případně short interfering RNA či silencing RNA) je označení pro skupinu dvouvláknových RNA o délce 20-25 nukleotidů.
SLC transportéry	Solute carrier transporters- skupina transportérů obsahující přes 300 rozdělených do 51 rodina
SLC28A1	SLC transportér- člen 1 rodiny 28A
SLC28A2	SLC transportér- člen 2 rodiny 28A
SLC28A3	SLC transportér- člen 3 rodiny 28A
SLC29A1	SLC transportér- člen 1 rodiny 29A
SLC29A2	SLC transportér- člen 2 rodiny 29A
SLC29A3	SLC transportér- člen 3 rodiny 29A
SNP(s)	Jednonukleotidový polymorfismus/polymorfismy (<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism/(s)-označuje množné číslo)
SOD2	Gen SOD2 (<u>S</u> uperoxide <u>d</u> ismutase <u>2</u>)
SOD3	Gen SOD3 (<u>S</u> uperoxide <u>d</u> ismutase <u>3</u>)
STD	<u>S</u> tandard
SULT	<u>S</u> ulfotransferáza
SZÚ	<u>S</u> tátní <u>z</u> dravotní <u>ú</u> stav v Praze
T	Thymin (2,6-dihydroxy-5-methylpyrimidin, 5-methyluracil; pyrimidinová báze)

TAP1/2	Transportér související s přípravou antigenu pro prezentaci (Transporter associated with <u>antigen processing</u> 1/ 2)
TBE	TBE (Tris/Borate/EDTA)- pufr obsahující mix Tris, Kyselinu boritou, EDTA
TBP	Gen TBP (Tata <u>Box-binding Protein</u>)
TFRC	Gen TFRC (Transferrin <u>receptor</u>)
TMD	Doména přemosťující buněčnou membránu (Transmembrane <u>Domain</u>)
TNM klasifikace	odráží znalost rozsahu primárního tumoru (<u>T-tumor</u>), nepřítomnost či přítomnost metastáz v regionálních lymfatických uzlinách (<u>N-nodes</u>) a nepřítomnost či přítomnost vzdálených metastáz (<u>M-metastasis</u>)
TP53	Gen TP53 (Tumor protein <u>p53</u>)
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
Tyr	Tyrosin ((2S)-2-Amino-3-(4-hydroxyfenyl)-propanová kyselina)
UGT	<u>UDP-glukuronosyl transferáza</u>
Val	Valin ((2S)-2-amino-3-methyl-butanová kyselina)
XME	Enzymy metabolizující cizorodé sloučeniny (<u>Xenobiotic metabolizing enzymes</u>)
YWHAZ	Gen YWHAZ (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation protein, Zeta isoform)

9. SEZNAM PŘÍLOH

Číslo	Název
1.	Mohelnikova-Duchonova B, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovský Z, Soucek P. CYP2A13, ADH1B, and ADH1C gene polymorphisms and pancreatic cancer risk. <i>Pancreas</i> . 2010 ;39(2):144-8.
2.	Mohelnikova-Duchonova B, Marsakova L, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovský Z, Slamova A, Schejbalova M, Soucek P. Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. <i>Pancreas</i> . 2011 ;40(1):72-8.
3.	Vrana D, Pikhart H, Mohelnikova-Duchonova B, Holcatova I, Strnad R, Slamova A, Schejbalova M, Ryska M, Susova S, Soucek P. The association between glutathione S-transferase gene polymorphisms and pancreatic cancer in a central European Slavonic population. <i>Mutat Res</i> . 2009 ;680(1-2):78-81.
4.	Mohelnikova-Duchonova B, Havranek O, Hlavata I, Foretova L, Kleibl Z, Pohlreich P, Soucek P. CHEK2 gene alterations in the forkhead-associated domain, 1100delC and del5395 do not modify the risk of sporadic pancreatic cancer. <i>Cancer Epidemiol</i> . 2010 ;34(5):656-8.
5.	Hlavata I, Vrana D, Smerhovský Z, Pardini B, Naccarati A, Vodicka P, Novotný J, Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P. Association between exposure-relevant polymorphisms in CYP1B1, EPHX1, NQO1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 and risk of colorectal cancer in a Czech population. <i>Oncol Rep</i> . 2010 ;24(5):1347-53.
6.	Soucek P, Susova S, Mohelnikova-Duchonova B, Gromadzinska J, Moraviec-Sztandera A, Vodicka P, Vodickova L. Polymorphisms in metabolizing enzymes and the risk of head and neck squamous cell carcinoma in the Slavic population of the central Europe. <i>Neoplasma</i> . 2010 ;57(5):415-21.
7.	Mohelnikova-Duchonova B, Oliverius M, Honsova E, Soucek P. Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma. <i>Dis Markers</i> . 2011 - přijato k publikaci.
8.	Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, Liska V, Pitule P, Novak P, Bruha J, Vycital O, Holubec L, Treska V, Vodicka, P, Soucek P. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. <i>Mutagenesis</i> . 2012 ;27(2):187-96.
9.	Mohelnikova-Duchonova B. Pancreatic Cancer: What is the Role of ABC Transporters? <i>Pancreatic Dis Ther</i> . 2011 ;1:e101. doi:10.4172/pdt.1000e101
10.	Mohelníková-Duchonová B, Soucek P. Role membránových transportérů v chemorezistenci karcinomu pankreatu při terapii gemcitabinem. <i>Klin Onkol</i> . 2010 ;23(5):306-10.
11.	Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P, The Role of Membrane Transporters in Cellular Resistance of Pancreatic Carcinoma to Gemcitabine and Erlotinib. In: <i>Horizons in Cancer Research, Volume 46</i> , (Hiroto S. Watanabe ed.), NOVA Science Publishers Inc., NY, USA, 2011.

Příloha č. 1

Mohelnikova-Duchonova B, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z, Soucek P.

CYP2A13, ADH1B, and ADH1C gene polymorphisms and pancreatic cancer risk.

Pancreas. **2010**;39(2):144-8. (IF₂₀₁₂ = 2,6)

CYP2A13, ADH1B, and ADH1C Gene Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk

Beatrice Mohelnikova-Duchonova, MD,*† David Vrana, MD,*‡ Ivana Holcatova, MD, PhD,§
Miroslav Ryska, MD, PhD,|| Zdenek Smerhovsky, MD, PhD,¶ and Pavel Soucek, PhD*

Objectives: Pancreatic carcinoma etiology and molecular pathogenesis are weakly understood. Based on the assumption that genetic variation in carcinogen metabolism further modifies the risk of exposure-related cancers, we studied the association of polymorphisms in the tobacco carcinogen-metabolizing gene CYP2A13 (Arg101Stop) and the alcohol-metabolizing genes ADH1B (Arg48His) and ADH1C (Ile350Val) with pancreatic cancer risk.

Methods: Polymorphisms were studied by allelic discrimination.

Results: In a hospital-based case-control study, CYP2A13 variant alleles coding an inactive enzyme were found in 7 of 265 cancer-free controls and in none of 235 pancreatic carcinoma patients. Neither ADH1B or ADH1C polymorphisms alone nor their combinations showed a significant effect on pancreatic cancer risk.

Conclusions: The first study of the roles of CYP2A13, ADH1B, and ADH1C in pancreatic cancer etiology suggested that the controls may have a lower ability to bioactivate tobacco-derived procarcinogens than the cases.

Key Words: pancreas, cancer, polymorphism, CYP2A13, ADH1

(*Pancreas* 2010;39: 144–148)

Pancreatic carcinoma (*International Statistical Classification of Diseases, 10th Revision; C25; OMIM, 260350*) is the fourth leading cause of cancer-related deaths in the Czech Republic, with only a minimum number of patients surviving in 5 years.^{1,2} Contrary to the poor prognosis associated with this disease, its etiology and molecular pathogenesis are still weakly understood.

Tobacco smoke has been evaluated as a potential risk factor for pancreatic cancer, and a number of studies have also suggested that ethanol, together with elements of cigarette smoke, may act as a cocarcinogen and enhance tumor formation.^{3–5} It is assumed that genetic variation in carcinogen metabolism further modifies the risk of exposure-related cancer.⁶

Tobacco carcinogens such as 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) are metabolized in the human body by cytochromes P450 (P450, EC 1.14.14.1). NNK induces lung tumors in all laboratory animals tested and nasal cavity tumors, pancreatic cancer, and liver tumors in rats.^{7,8} P450 2A13

was suggested as the most active enzyme in metabolic activation of NNK.⁹ The nonsense polymorphism, CYP2A13*1/*7 (rs72552266 and Arg101Stop), may be an important modifier of tobacco-associated cancer risk because the truncated protein lacks enzymatic activity.¹⁰

Ethanol metabolism in pancreatic acinar cells is mediated by both the oxidative and the nonoxidative pathways.^{11–13} The oxidative pathway is particularly catalyzed by alcohol dehydrogenases (ADH, EC 1.1.1.1), aldehyde dehydrogenases (ALDH, EC 1.2.1.5), and less by P450 2E1.¹⁴ Previous case-control studies proved the association between the ADH1B*1 allele and an increased risk of esophageal cancer,^{15,16} and squamous cell carcinoma of the head and neck.¹⁷ Slow metabolizers (because of ADH1B*1) had also significantly increased the risk of colorectal cancer in a Japanese population (odds ratio [OR], 1.32; 95% confidence interval [CI], 1.07–1.63). Carriage of the ADH1C*2/*2 genotype increased the risk of oral squamous cell carcinoma in heavy (OR, 2.65; 95% CI, 1.08–2.14) and moderate (OR, 1.6; 95% CI, 1.15–2.03) drinkers.¹⁸

The goal of this study was to explore whether polymorphisms in the genes of the principal tobacco- and ethanol-metabolizing enzymes CYP2A13 (OMIM, 608055), ADH1B (OMIM, 103720), and ADH1C (OMIM, 103730) modify susceptibility to pancreatic cancer. These associations were not studied in pancreatic cancer etiology so far.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Both the cases and the cancer-free controls were of white Czech origin recruited in the period between September 2004 and February 2008. A total of 630 participants were recruited during the study period. All cases were incident pancreatic cancer patients attending 5 oncology and surgery departments in Prague and 1 in Pribram (central Bohemia). Pancreatic cancer diagnosis in patients was periodically reconfirmed. Thirty-eight patients were excluded because of a diagnosis other than pancreatic cancer (15, pancreatitis and 23, other diagnoses) found during follow-up. As a result, 142 patients with a histologically verified diagnosis and 118 patients with a clinically verified diagnosis were included into the study. Twenty-five of the verified cases were excluded because variables needed for the analysis (such as age) were not available to investigators. Clinical-pathological data on patients were collected from their medical records (date of diagnosis, stage, grade, and histologic diagnosis were available). The randomly selected controls were 332 healthy individuals from the same catchment areas as the cases and consisted of 2 independent groups: cancer-free subjects recruited during the 3 months after the recruitment of the cases by general practitioners in Prague (179 controls) and blood donors from 2 centers in Prague and Pribram (153 controls). The controls were included into the study under the condition that the difference in their age was not larger than 5 years from cases recruited in the same period. No other selection

From the *Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health; †First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; ‡Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital; §Institute of Hygiene and Epidemiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; ||Department of Surgery, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Central Military Hospital; and ¶Institute of Epidemiology, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

Received for publication March 2, 2009; accepted August 4, 2009.

Reprints: Pavel Soucek, PhD, Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic (e-mail: psoucek@szu.cz).

This work was supported by the Internal grant agency of the Ministry of Health, Czech Republic (grants Nos. 8563-5 and 9422-3).

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

criteria were applied to the recruitment of the controls. Basic epidemiological data on all participants were collected from a face-to-face questionnaire survey (personal and family history, short occupational history, smoking and drinking history, history of physical activity, reproductive history, and nutritional information). Sixty-seven controls were excluded because variables needed for the analysis were missing. Blood samples of 235 cases and 265 controls were available in sufficient quality for genotyping. All participants were informed and gave their written consent to participate in the study. The design of the study was approved by the ethical committee of the First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.

DNA Isolation and Genotyping

Blood was collected during diagnostic procedures using tubes with a K₃EDTA anticoagulant. Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes using a BioSprint 15 DNA Blood kit (Qiagen, Valencia, Calif) by KingFisher mL automated system (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) according to the procedure supplied by the manufacturer. Polymorphisms in CYP2A13 (*1/*7, Arg101STOP), ADH1B (Arg48His, rs1229984), and ADH1C (Ile350Val, rs698) were determined by TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (assay ID Nos. C_30634006_10, C_2688467_20, and C_26457410_10, respectively) obtained from Applied Biosystems (Foster City, Calif). Reaction mixtures for real-time polymerase chain reaction (PCR) contained 5 μ L of 2 \times TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) for CYP2A13 and ADH1C or 5 μ L AB Solute QPCR ROX Mix (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Ill) for ADH1B, 0.25 μ L of TaqMan drug metabolism genotyping assays, and 4.75 μ L of DNA template diluted to a concentration of 0.7 ng/ μ L. Cycling parameters for CYP2A13 and ADH1C were initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 55 cycles consisting of denaturation at 92°C for 15 seconds and annealing at 58°C for 90 seconds. The following cycling conditions were used for ADH1B: initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing at 62°C for 60 seconds. The nontemplate control consisted of a reaction tube in which water was used in place of DNA sample. Real-time PCR was performed using the RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Ten percent of the randomly selected samples were reanalyzed with 100% concordance of the results.

Statistical Analysis

In the first round of analyses, the Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the control group. The distribution of genotypes did not significantly deviate from the equilibrium. Then, we used the binary logistic regression to estimate the ORs, the 95% CI for the OR, and the corresponding *P* values of the different genotype frequencies among the pancreatic cancer and the control groups, adjusting for the age at recruitment, sex, weight, diabetes, pancreatitis, smoking, alcohol drinking, and coffee and tea consumption. Furthermore, we attempted to test for modifying the effect of smoking and alcohol, coffee, and tea consumptions on the associations of interest. Because we failed to demonstrate interactions between potential modifiers of effect and studied genotypes, this part of the statistical analysis is not reported. A *P* < 0.05 would be considered significant. Analyses were performed using the Win SPSS v13.0 (SPSS, Chicago, Ill).

RESULTS

Characteristics of the Studied Population

Complete characteristics of the studied population are presented in Table 1. Our analyses confirmed high age at re-

TABLE 1. Characteristics of the Studied Population

	Controls	Cases
Sex, n		
Male	158	148
Female	107	87
Total	265	235
Age at recruitment, yr		
Mean \pm SD	57.9 \pm 10.6	61.9 \pm 10.5
Total	265	235
Weight, kg		
Mean \pm SD	76.0 \pm 14.5	67.5 \pm 15.0
Total	262	235
Personal history of diabetes, n		
Negative	245	194
Positive	17	33
Total	262	227
Personal history of pancreatitis, n		
Negative	258	212
Positive	4	15
Total	262	227
Smoking, n		
Never smoker	104	71
Former smoker (>10 yr)	53	34
Former smoker (0–10 yr)	22	25
Current smoker	75	57
Total	254	187
Alcohol, n		
Teetotaler	77	68
Former drinker	39	51
Regular drinker	140	68
Total	256	187
Coffee, n		
Never (or <1/mo)	34	73
<1/wk	4	7
1–2/wk	26	14
3–5/wk	14	18
1–2/d	135	85
3–4/d	43	22
>4/d	6	9
Total	262	228
Tea, n		
Never (or <1/mo)	68	99
<1/wk	15	14
1–2/wk	32	28
3–5/wk	36	27
1–2/d	70	52
3–4/d	32	7
>4/d	9	1
Total	262	228

cruitment (OR, 1.03; 95% CI, 1.00–1.05; *P* = 0.016), male sex (OR, 2.70; 95% CI, 1.65–4.43; *P* < 0.001), low weight (OR, 1.06; 95% CI, 1.04–1.08; *P* < 0.001), and positive personal history of pancreatitis (OR, 9.93; 95% CI, 2.63–37.52; *P* = 0.001) or diabetes (OR, 4.09; 95% CI, 1.95–8.55; *P* < 0.001) as pancreatic cancer risk predictors. Tea drinkers (more than 3 teacups per day) had significantly reduced pancreatic cancer

risk than others (less than 3 teacups per day; OR, 0.16; 95% CI, 0.07–0.40; $P < 0.001$). Smoking, alcohol consumption, and coffee drinking played no role as independent risk factor (results not shown).

CYP2A13, ADH1B, ADH1C Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk

In age-, sex-, weight-, diabetes-, pancreatitis-, smoking-, alcohol-, coffee- and tea-adjusted analyses, neither ADH1B or ADH1C polymorphisms alone nor their combinations showed a significant effect on pancreatic cancer risk (Table 2). Both interactions and potential additive effects were followed in statistical analyses. Neither ADH1B nor ADH1C polymorphisms showed significant association with pancreatic cancer risk in drinkers compared with nondrinkers in adjusted analyses (results not shown). CYP2A13 variant allele *7 coding inactive enzyme was found in 7 of the 265 cancer-free controls and in none of the 235 pancreatic carcinoma patients (Table 2). Although the trend seems strong, it could not be confirmed by statistical analysis because of the absence of CYP2A13*7 carriers in the pancreatic cancer case group. In the subgroup analysis, 2 of 104 smokers and 4 of 150 nonsmokers carried the CYP2A13*7 allele among the controls with data available.

DISCUSSION

Pancreatic cancer typically has poor prognosis and very high mortality. The etiology and the molecular pathogenesis of this cancer are still weakly understood. In our study, we con-

firmed a significant effect of most of the previously published pancreatic cancer risk factors (age, sex, weight, and personal history of chronic pancreatitis or diabetes).^{19,20} We have not observed any effect of tobacco smoking, alcohol consumption, and coffee drinking, but individuals who drank more than 3 teacups per day had significantly reduced pancreatic cancer risk than others. This result supports the previous study on Polish pancreatic cancer patients that found a strongly significant trend of decreasing risk with increasing lifetime consumption of tea ($P < 0.001$)²¹ but contradicts to the recent Japanese study reporting null result.²² Discrepancy of results may be due to the differences in tea drinking habits, tea quality, or study design.

Besides alterations of high-penetrance genes, interaction of environmental factors with low-penetrance genes is suspected to contribute to pancreatic cancer onset. Despite the fact that other cancer types were frequently studied regarding gene-environment interactions, pancreatic cancer belongs to the least-studied cancers. Perhaps, because of the difficulties with recruitment of patients who are quite often in very poor performance status and have rather short overall survival, the number of published studies is rather low. We aimed to investigate the contribution of functionally relevant polymorphisms in CYP2A13, ADH1B, and ADH1C to pancreatic cancer susceptibility in the case-control study of a central European population with one of the highest incidences in the Western world. We observed clear prevalence of the variant CYP2A13 allele causing premature stop at codon 101 (knockout allele *7) among the controls in comparison with the pancreatic cancer patients. Because there was no carrier of CYP2A13*7 among the cases, the significance of this association with pancreatic

TABLE 2. Genotype Distribution in the Studied Population

Gene/Genotype	Controls	Cases	OR*	95% CI*	P
CYP2A13					
Arg/Arg	258	235	Reference		
Arg/STOP	7	0	—†		
STOP/STOP	0	0	—†		
Total	265	235			
ADH1B					
Arg/Arg	242	213	Reference		
Arg/His	22	22	1.25	0.56–2.77	0.583
His/His	1	0	—†		
Arg/His + His/His	23	22	1.16	0.53–2.55	0.706
Total	265	235			
ADH1C					
Ile/Ile	80	83	Reference		
Ile/Val	138	109	0.93	0.56–1.53	0.766
Val/Val	46	43	1.65	0.87–3.13	0.123
Ile/Val + Val/Val	184	152	1.09	0.68–1.74	0.730
Total	264	235			
ADH1B + ADH1C I					
Arg/Arg + Ile/Ile	70	71	Reference		
(Arg/His or Arg/Arg) or (Ile/Val or Ile/Ile)	196	164	1.16	0.70–1.90	0.566
ADH1B × ADH1C II					
Arg/Arg + Ile/Ile	70	71	Reference		
(Arg/His or Arg/Arg) and (Ile/Val or Ile/Ile)	11	10	1.09	0.31–3.85	0.888

*Adjusted for age at recruitment, sex, weight, diabetes, pancreatitis, smoking, alcohol drinking, and coffee and tea consumptions.

†Statistics could not be performed because of the absence of individuals in 1 or more of the analyzed groups.

cancer risk could not be statistically evaluated. Nevertheless, bearing in mind the well-proven pivotal role of P450 2A13 in bioactivation of tobacco smoke-borne xenobiotics⁹ and the hypothetically lower activity of this enzyme in the control group than in the patients (lacking the knockout allele), our result seems highly relevant. Moreover, the previously published multivariate analysis showed an elevated risk for small cell lung cancer in subjects heterozygous for CYP2A13*7 (OR, 9.9; 95% CI, 1.9–52.2).²³ Several polymorphisms exist in CYP2A13. Although the most frequently studied Cys variant in codon 257 of CYP2A13 (Single Nucleotide Polymorphism database, rs8192789) has been associated with the substantially reduced risk of lung adenocarcinoma in the Chinese population (OR, 0.41; 95% CI, 0.23–0.71),²⁴ it unlikely impacts NNK metabolism *in vivo*.²⁵ However, a protective or additive effect of other CYP2A13 alleles with unknown functional relevance cannot be ruled out.²⁶

Alcohol dehydrogenase and ALDH activities were detected in the human pancreas, and the activity of ADH was much higher than that of ALDH.^{27,28} Moreover, in pancreatic cancer tumors, the activity of ADH1C was significantly higher than that in healthy tissues ($P < 0.001$). By genotyping 9080 white individuals from the general population, the ADH1B slow metabolizers with genotype ADH1B*1/*1 drank more alcohol and had a higher risk of alcoholism than fast alcohol metabolizers (ADH1B*2/*2; rs1229984).²⁹ In addition, the slower ADH activity haplotype (ADH1B*1-ADH1C*2) was associated with a higher risk of being a drinker.³⁰ The relation between ADH activity and alcohol exposure is thus well documented, and the presence of high levels of ADHs in pancreatic cancer tissues makes these enzymes an attractive target for the study of pancreatic cancer etiology. The role of alcohol in pancreatic cancer etiology is controversial.^{31,32} Genkinger et al³³ conducted a pooled analysis of the primary data from 14 prospective cohort studies. The study sample consisted of 862,664 individuals, among whom 2187 incident pancreatic cancer cases were identified. Their findings are consistent with a modest increase in the risk of pancreatic cancer (RR, 1.22; 95% CI, 1.03–1.45) with a consumption of 30 or more grams of alcohol per day.³³

However, in our study, ADH1B or ADH1C polymorphisms alone nor their combinations showed a significant effect on pancreatic cancer risk in risk factor-adjusted analyses. Drinking status did not play a significant role in the stratified analyses as well.

To our knowledge, we present the first study evaluating the role of CYP2A13, ADH1B, and ADH1C polymorphisms in pancreatic cancer in a white population. The observed prevalence of the CYP2A13*7 knockout allele among pancreatic cancer patients requires replicate studies in related populations of white origin.

REFERENCES

1. Cancer Incidence 2005 in the Czech Republic IHS CR, NOR CR, Czech Republic. 2008;62.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58:71–96.
3. Zhang L, Weddle DL, Thomas PE, et al. Low levels of expression of cytochromes P-450 in normal and cancerous fetal pancreatic tissues of hamsters treated with NNK and/or ethanol. *Toxicol Sci*. 2000;56:313–323.
4. Silverman DT, Brown LM, Hoover RN, et al. Alcohol and pancreatic cancer in blacks and whites in the United States. *Cancer Res*. 1995;55:4899–4905.
5. Malats N, Porta M, Corominas JM, et al. Ki-ras mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. PANK-ras I Project Investigators. *Int J Cancer*. 1997;70:661–667.
6. Suzuki H, Morris JS, Li Y, et al. Interaction of the cytochrome P4501A2, SULT1A1 and NAT gene polymorphisms with smoking and dietary mutagen intake in modification of the risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2008;29:1184–1191.
7. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol*. 1998;11:559–603.
8. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1194–1210.
9. Su T, Bao Z, Zhang QY, et al. Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res*. 2000;60:5074–5079.
10. Zhang X, Chen Y, Liu Y, et al. Single nucleotide polymorphisms of the human cyp2a13 gene: evidence for a null allele. *Drug Metab Dispos*. 2003;31:1081–1085.
11. Haber PS, Apte MV, Applegate TL, et al. Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med*. 1998;132:294–302.
12. Haber PS, Apte MV, Moran C, et al. Nonoxidative metabolism of ethanol by rat pancreatic acini. *Pancreatol*. 2004;4:82–89.
13. Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, et al. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology*. 2002;122:106–118.
14. Vonlaufen A, Wilson JS, Pirola RC, et al. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Res Health*. 2007;30:48–54.
15. Yang SJ, Wang HY, Li XQ, et al. Genetic polymorphisms of ADH2 and ALDH2 association with esophageal cancer risk in southwest China. *World J Gastroenterol*. 2007;13:5760–5764.
16. Lee CH, Lee JM, Wu DC, et al. Carcinogenic impact of ADH1B and ALDH2 genes on squamous cell carcinoma risk of the esophagus with regard to the consumption of alcohol, tobacco and betel quid. *Int J Cancer*. 2008;122:1347–1356.
17. Hiraki A, Matsuo K, Wakai K, et al. Gene-gene and gene-environment interactions between alcohol drinking habit and polymorphisms in alcohol-metabolizing enzyme genes and the risk of head and neck cancer in Japan. *Cancer Sci*. 2007;98:1087–91.
18. Solomon PR, Selvam GS, Shanmugam G. Polymorphism in ADH and MTHFR genes in oral squamous cell carcinoma of Indians. *Oral Dis*. 2008;14:633–639.
19. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A metaanalysis. *JAMA*. 1995;273:1605–1609.
20. Mukesh V. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat*. 2005;4:295–301.
21. Zatonski WA, Boyle P, Przewozniak K, et al. Cigarette smoking, alcohol, tea and coffee consumption and pancreas cancer risk: a case-control study from Opole, Poland. *Int J Cancer*. 1993;53:601–607.
22. Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi A, et al. JACC Study Group, green tea consumption and the risk of pancreatic cancer in Japanese adults. *Pancreas*. 2008;37:25–30.
23. Cauffiez C, Lo-Guidice JM, Quaranta S, et al. Genetic polymorphism of the human cytochrome CYP2A13 in a French population: implication in lung cancer susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;30:662–669.
24. Wang H, Tan W, Hao B, et al. Substantial reduction in risk of lung adenocarcinoma associated with genetic polymorphism in CYP2A13, the most active cytochrome P450 for the metabolic activation of tobacco-specific carcinogen NNK. *Cancer Res*. 2003;63:8057–8061.
25. Schlicht KE, Michno N, Smith BD, et al. Functional characterization of CYP2A13 polymorphisms. *Xenobiotica*. 2007;37:1439–1449.
26. Sim SC. CYP2A13 allele nomenclature. Available at: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2a13.htm>. Accessed August 31, 2009.
27. Chrostek L, Jelski W, Szmikowski M, et al. Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the human pancreas. *Dig Dis Sci*. 2003;48:1230–1233.

28. Jelski W, Chrostek L, Szmitkowski M. The activity of class I, II, III, and IV of alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2007;35:142–146.
29. Tolstrup JS, Nordestgaard BG, Rasmussen S, et al. Alcoholism and alcohol drinking habits predicted from alcohol dehydrogenase genes. *Pharmacogenomics J*. 2008;8:220–227.
30. Matsuo K, Hiraki A, Hirose K, et al. Impact of the alcohol-dehydrogenase (ADH)1C and ADH1B polymorphisms on drinking behavior in nonalcoholic Japanese. *Hum Mutat*. 2007;28:506–510.
31. Jiao L, Silverman DT, Schairer C, et al. Alcohol use and risk of pancreatic cancer: the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Epidemiol*. 2009;169:1043–1051.
32. Rohrmann S, Linseisen J, Vrieling A, et al. Ethanol intake and the risk of pancreatic cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control*. 2009;20:785–794.
33. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:765–776.

Příloha č. 2

Mohelnikova-Duchonova B, Marsakova L, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z, Slamova A, Schejbalova M, Soucek P.

Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk.

Pancreas. 2011;40(1):72-8. (IF₂₀₁₂ = 2,6)

Superoxide Dismutase and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Quinone Oxidoreductase Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk

Beatrice Mohelnikova-Duchonova, MD,*† Lenka Marsakova, MSc,*‡ David Vrana, MD,*§ Ivana Holcatova, MD, PhD,|| Miroslav Ryska, MD, PhD,¶ Zdenek Smerhovsky, MD, PhD,# Alena Slamova, MD, PhD,|| Miriam Schejbalova, MD, PhD,|| and Pavel Soucek, PhD*

Objectives: Pancreatic carcinoma etiology and molecular pathogenesis is weakly understood. According to the assumption that genetic variation in carcinogen metabolism further modifies the risk of exposure-related cancers, an association of functional polymorphisms in oxidative stress-modifying genes superoxide dismutase 2 (*SOD2* [Ala16Val, rs4880]), *SOD3* (Arg231Gly, rs1799895), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:quinone oxidoreductase (*NQO1* [Pro187Ser, rs1800566]), and *NQO2* (Phe47Leu, rs1143684) with pancreatic cancer risk was studied.

Methods: Polymorphisms were studied by allelic discrimination.

Results: In a hospital-based case-control study on 500 individuals (235 cases and 265 controls) of Czech white origin, *SOD2*, *SOD3*, *NQO1*, and *NQO2* polymorphisms showed no significant association with pancreatic cancer risk. Major lifestyle factors such as smoking and alcohol, coffee, or tea consumption did not modify the effect of the studied polymorphisms.

Conclusions: The first European study of the *SOD2*, *SOD3*, *NQO1*, and *NQO2* roles in pancreatic cancer etiology did not find significant associations. Despite this observation, other populations with different lifestyle(s) may be at risk and should be further studied.

Key Words: pancreas, cancer, susceptibility, superoxide dismutase, quinone oxidoreductase

(*Pancreas* 2011;40: 72–78)

Pancreatic carcinoma (*International Statistical Classification of Diseases, 10th Revision, C25; Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM], 260350*) is the fourth leading cause of cancer-related death in the Czech Republic, with only a minimum number of patients surviving by 5 years.^{1,2}

The etiology and molecular pathogenesis of the disease is still weakly understood. Published risk factors include age, sex, diabetes, obesity, history of chronic pancreatitis, diet rich in fat, tobacco, and infection by *Helicobacter pylori*.^{3–5} Alcohol is suspected to promote carcinogenesis. However, epidemiologic studies have reported inconsistent results on associations of alcohol intake with pancreatic cancer risk.^{6,7} Metabolism of

environmentally important contaminants (both activation of pre-carcinogens and detoxification of carcinogens) may present an important susceptibility factor as well. Polymorphisms in genetically variable xenobiotic-metabolizing enzymes may modify the risk of carcinogenesis.⁸

Reactive oxygen species are potential carcinogens because they facilitate mutagenesis and tumor promotion and progression.^{9–11} The genotoxic superoxide anion radical is formed by the univalent reduction of triplet-state molecular oxygen. This process is mediated by enzymes such as nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases and xanthine oxidase or nonenzymatically by redox-reactive compounds such as the semi-ubiquinone compound of the mitochondrial electron transport chain.¹²

Manganese superoxide dismutase (MnSOD or SOD2; OMIM, 147460) converts the superoxide anion radical into hydrogen peroxide and oxygen in mitochondria and plays a key role in protecting cells from oxidative damage. The *SOD2* polymorphism (Ala16Val, rs4880) in gene signal sequence leads to a conformational change in the helical structure of the protein. The Val variant of the enzyme has lower efficiency of transport into mitochondria.¹³ Previous studies found a significantly higher risk of lung,¹⁴ bladder,¹⁵ and breast cancer¹⁶ in individuals carrying the variant Val allele. Contrary to these findings, association of the wild-type *SOD2* Ala variant with increased acoustic neuroma and prostate cancer risk was found.^{17,18} The homozygous variant genotype (Val/Val) has been associated with a higher risk of pancreatic cancer (odds ratio [OR], 1.96; 95% confidence interval [CI], 1.0–3.8).¹⁹ The extracellular isoform of SOD has Cu and Zn in the catalytic center (extracellular SOD or SOD3; OMIM, 185490). Several polymorphisms in *SOD3* have been studied (Ex3-631C>G, rs1799895; IVS1-186C>T, rs699473; Ex3-516 C>T, rs2853796; and Ex3-489 C>T, rs2855262), but the association with cancer risk has not been found.¹⁸

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:quinone oxidoreductase (*NQO1*; OMIM, 125860) protects cells from oxidative damage by catalyzing the reduction of carcinogenic quinoid compounds to their hydroquinone forms. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:quinone oxidoreductase can use NADH and NADPH as cofactors, whereas *NQO2* (OMIM, 160998) requires the nonbiogenic compound dihydronicotinamide riboside or related molecules.²⁰ Both proteins have also been involved in the stabilization of tumor protein p53 (OMIM, 191170).²¹

Polymorphisms in exon 6 of *NQO1* (Pro187Ser, rs1800566) and exon 3 of *NQO2* (Phe47Leu, rs1143684) are associated with lower enzyme activities.^{22,23} Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:quinone oxidoreductase expression was suggested to be a possible candidate as a biomarker for pancreatic cancer, especially in smokers.²⁴

This study aimed to evaluate whether the association of pancreatic cancer risk with functional polymorphisms in *SOD2*

From the *Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health; †First Faculty of Medicine, and ‡Faculty of Sciences, Charles University in Prague; §Department of Oncology, and ||Institute of Hygiene and Epidemiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital; ¶Department of Surgery, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Central Military Hospital; and #Institute of Epidemiology, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

Received for publication February 8, 2010; accepted July 22, 2010.

Reprints: Pavel Soucek, PhD, Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic (e-mail: psoucek@szu.cz).

This study was supported by grant No. 9422-3 from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health, Prague, Czech Republic.

The authors have no conflicts of interest to declare.

Copyright © 2011 by Lippincott Williams & Wilkins

(Ala16Val, rs4880), *SOD3* (Arg231Gly, rs1799895), *NQO1* (Pro187Ser, rs1800566), and *NQO2* (Phe47Leu, rs1143684) exists. For this purpose, the first case-control study on European white population was conducted.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study design was described in detail elsewhere.²⁵ In brief, a total of 630 individuals of Czech white ancestry were included into the study in the period between September 2004 and February 2008. The cases were 298 incident pancreatic cancer patients attending 5 oncology and surgery departments in Prague and one in Píbram (central Bohemia). Patients were eligible for the study when they fulfilled at least 1 of the following criteria: (a) histology- or cytology-confirmed pancreatic adenocarcinoma and (b) at least 3 clinical signs of pancreatic cancer (presence of tumor mass revealed by endoscopic retrograde cholangiopancreatography, endoscopic ultrasound with fine needle aspiration biopsy, computed tomography or magnetic resonance imaging, weight loss, anorexia/cachexia, and obstructive jaundice). Clinical and pathological data on the cases (date of diagnosis, stage, grade, and histologic diagnosis where available) were collected from their medical records. Thirty-eight patients were excluded because of diagnoses other than pancreatic cancer (15 pancreatitis and 23 other diagnoses) found during follow-up. Randomly selected controls were 332 healthy individuals from the same catchment areas as the cases and consisted of 2 independent groups: cancer-free subjects recruited during the 3 months after recruitment of the cases by general practitioners in Prague (179 controls) and blood donors from 2 centers in Prague and Píbram (153 controls). The controls were included into the study under the condition that the difference in their age and that of the cases recruited in the same period was not larger than 5 years. No other selection criteria were applied to the recruitment of the controls. Basic epidemiologic data on all participants (personal and family history, short occupational history, physical activity, smoking-and-drinking history, and nutritional information) were collected. Sixty-seven controls and 25 cases were excluded because variables needed for the analysis were missing. All participants were informed and gave their written consent to participate in the study. The design of the study was approved by the Ethical Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

Study Questionnaires

All study participants filled out a self-guided, structured questionnaire to determine demographic characteristics and potential risk factors. The study subjects provided information on their lifestyle habits (smoking and drinking of alcohol, coffee, or tea), weight (in kilograms), personal history of diabetes, pancreatitis, and family/personal history of cancer. The characteristics of the study population have been reported previously.²⁵

DNA Isolation and Genotyping

Blood was collected during the diagnostic procedures by using tubes with a K3EDTA anticoagulant. Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes by using a BioSprint 15 DNA blood kit (Qiagen, Valencia, Calif) by KingFisher mL automated system (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) according to the procedure supplied by the manufacturer. Polymorphisms in *SOD2* (rs4880), *SOD3* (rs1799895), *NQO1* (rs1800566), and *NQO2* (rs1143684) were determined by real-time polymerase chain reaction using the RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) apparatus. The reaction

mixture contained 5 μ L of ABsolute QPCR ROX Mix (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Ill), 0.25 μ L of TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Assay IDs: C_8709053_10 for

TABLE 1. Characteristics of the Studied Population

	Controls, n (%)	Cases, n (%)
Sex		
Male	158 (60)	148 (63)
Female	107 (40)	87 (37)
Total	265	235
Age at recruitment, yr		
Mean \pm SD	57.9 \pm 10.6	61.9 \pm 10.5
Total	265	235
Weight, kg		
Mean \pm SD	76.0 \pm 14.5	67.5 \pm 15.0
Total	262	235
Personal history of diabetes		
Negative	245 (94)	194 (85)
Positive	17 (6)	33 (15)
Total	262	227
Personal history of pancreatitis		
Negative	258 (98)	212 (93)
Positive	4 (2)	15 (7)
Total	262	227
Smoking		
Never smoker	106 (41)	71 (38)
Former smoker >10 yr	54 (21)	34 (18)
Former smoker 0–10 yr	22 (9)	25 (13)
Current smoker	75 (29)	57 (31)
Total	257	187
Alcohol		
Nondrinker	78 (30)	68 (36)
Occasional drinker	40 (16)	51 (28)
Current drinker*	141 (54)	68 (36)
Total	259	187
Coffee		
Never or <1/mo	35 (13)	73 (32)
<1/wk	4 (2)	7 (3)
1–2/wk	26 (10)	14 (6)
3–5/wk	16 (6)	18 (8)
1–2/d	135 (51)	85 (37)
3–4/d	43 (16)	22 (10)
>4/d	6 (2)	9 (4)
Total	265	228
Tea		
Never or <1/mo	68 (25)	99 (43)
<1/wk	15 (6)	14 (6)
1–2/wk	32 (12)	28 (12)
3–5/wk	37 (14)	27 (12)
1–2/d	71 (27)	52 (23)
3–4/d	32 (12)	7 (3)
>4/d	10 (4)	1 (1)
Total	265	228

*Consumed more than 1 serving per day, where *serving* means approximately 15–20g of ethanol. This is the mean amount of ethanol in a common glass of beer (0.5 L), wine (0.2 L), and spirit (0.05 L) in the Czech Republic.

SOD2, C_2307506_10 for *SOD3*, C_2091255_30 for *NQO1*, and C_8774861_1 for *NQO2*; obtained from Applied Biosystems, Foster City, Calif), and 4.75 μ L of DNA template diluted to a concentration of 0.7 ng/ μ L. Cycling parameters were initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 50 cycles consisting of a denaturation at 95°C for 15 seconds and an annealing: for *SOD2* at 64°C for 15 seconds; *SOD3* and *NQO1*, 60°C for 60 seconds; and *NQO2*, 62°C for 60 seconds. The nontemplate control consisted of a reaction tube in which water was used in place of a DNA sample. Ten percent of randomly selected samples were reanalyzed, with 100% concordance of the results.

Statistical Analyses

In the first round of analyses, the Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the control group. The distribution of genotypes did not significantly deviate from the equilibrium. Differences in distribution of the genotypes between the cases and the controls were assessed from 2×2 tables, and the Pearson χ^2 test was used to test for their significance. Then the binary logistic regression was used to model the association between the risk of pancreatic cancer and the studied genotypes when controlling for the effects of age at recruitment, sex, weight, diabetes, pancreatitis, smoking, and alcohol, coffee, and tea consumption. Finally, the data were stratified according to different levels of variables for smoking and alcohol, coffee, and tea consumption to check for the presence of the modifying effect. A 2-sided $P < 0.05$ would be considered statistically significant. Analyses were performed using the Win SPSS v13.0 (SPSS, Chicago, Ill). The study had 80% power to detect an OR of 1.7 for *NQO1* and *NQO2* polymorphisms by using a dominant model

and *SOD2* by using a recessive model as calculated by Quanto v1.2.4 program (<http://hydra.usc.edu/gxe>).

RESULTS

Characteristics of the Studied Population

The complete characteristics of the studied population are displayed in Table 1. Our previous study showed advanced age at recruitment ($P = 0.016$), low weight ($P < 0.001$), positive personal history of pancreatitis ($P < 0.001$), and diabetes ($P < 0.001$) as the pancreatic cancer risk predictors.²⁵ Tea drinkers (>3 teacups per day) had a significantly reduced pancreatic cancer risk than those who drank less than 3 teacups per day ($P < 0.001$). Smoking, alcohol consumption, and coffee drinking played no role as independent risk factors.²⁵

SOD2, *SOD3*, *NQO1*, and *NQO2* Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk

Unadjusted analyses did not detect any of the genotypes as a potential pancreatic cancer risk factor (results not shown). Age-, sex-, weight-, diabetes-, pancreatitis-, smoking-, alcohol-, coffee- and tea-adjusted logistic regression also failed to find any significant association of all analyzed genotypes and alleles with the risk (Table 2). No significant interactions between the potential modifiers of effect, that is, the exposure factors (smoking, alcohol, coffee, and tea) and the studied genotypes were found either (Tables 3–6).

DISCUSSION

Pancreatic cancer is a dreadful disease with medium incidence but extremely high mortality and short survival.

TABLE 2. Associations of *SOD2*, *SOD3*, *NQO1*, and *NQO2* Polymorphisms With Pancreatic Cancer Risk

Genotype	Controls, n (%)	Cases, n (%)	OR*	95% CI	P
<i>SOD2</i> , rs4880					
Ala/Ala	58 (21.9)	48 (20.4)	Reference	—	—
Ala/Val	134 (50.6)	121 (51.5)	1.24	0.72–2.12	0.440
Val/Val	73 (27.5)	66 (28.1)	1.04	0.57–1.90	0.896
Ala/Val + Val/Val	207	187	1.16	0.70–1.93	0.560
Total	265	235			
<i>SOD3</i> , rs1799895					
Arg/Arg	264 (99.6)	229 (97.4)	Reference	—	—
Arg/Gly	1 (0.4)	6 (2.6)	4.41	0.42–46.05	0.215
Gly/Gly	0	0	—†	—†	—†
Total	265	235			
<i>NQO1</i> , rs1800566					
Pro/Pro	187 (70.6)	164 (69.8)	Reference	—	—
Pro/Ser	71 (26.8)	64 (27.2)	1.12	0.69–1.81	0.642
Ser/Ser	7 (2.6)	7 (3.0)	1.70	0.47–6.19	0.418
Pro/Ser + Ser/Ser	78	71	1.16	0.73–1.85	0.523
Total	265	235			
<i>NQO2</i> , rs1143684					
Phe/Phe	153 (57.7)	146 (62.1)	Reference	—	—
Phe/Leu	104 (39.3)	78 (33.2)	0.82	0.53–1.27	0.375
Leu/Leu	8 (3.0)	11 (4.7)	1.23	0.37–4.06	0.734
Phe/Leu + Leu/Leu	112	89	0.85	0.55–1.30	0.447
Total	265	235			

*Adjusted for the effects of age at recruitment, sex, weight, diabetes, pancreatitis, smoking, and alcohol, coffee, and tea consumptions.

†Significance could not be determined because of the absence of variants in both studied groups.

Despite efforts of molecular epidemiologists and geneticists, the etiology and molecular pathogenesis of this cancer is still weakly understood.

TABLE 3. Genotype Distribution According to Smoking Status

Genotype	Controls	Cases	OR*	95% CI	P
Never smokers					
<i>SOD2</i> , rs4880					
Ala/Ala	22	18	Reference	—	—
Ala/Val	53	32	0.74	0.34–1.58	0.434
Val/Val	31	21	0.83	0.36–1.96	0.657
Ala/Val + Val/Val	84	53	0.77	0.38–1.57	0.474
Total	106	71			
<i>SOD3</i> , rs1799895					
Arg/Arg	103	69	Reference	—	—
Arg/Gly	3	2	0.99	0.16–6.11	0.996
Gly/Gly	0	0	—†	—†	—†
Total	106	71			
<i>NQO1</i> , rs1800566					
Pro/Pro	74	50	Reference	—	—
Pro/Ser	29	17	0.87	0.43–1.74	0.690
Ser/Ser	3	4	1.97	0.42–9.20	0.387
Pro/Ser + Ser/Ser	32	21	0.97	0.50–1.87	0.931
Total	106	71			
<i>NQO2</i> , rs1143684					
Phe/Phe	58	36	Reference	—	—
Phe/Leu	46	33	1.16	0.63–2.13	0.642
Leu/Leu	2	2	1.61	0.22–11.95	0.641
Phe/Leu + Leu/Leu	48	35	1.18	0.64–2.15	0.600
Total	106	71			
Current and former smokers					
<i>SOD2</i> , rs4880					
Ala/Ala	36	24	Reference	—	—
Ala/Val	72	63	1.31	0.71–2.43	0.388
Val/Val	43	29	1.01	0.50–2.03	0.974
Ala/Val + Val/Val	115	92	1.20	0.67–2.15	0.541
Total	151	116			
<i>SOD3</i> , rs1799895					
Arg/Arg	151	113	Reference	—	—
Arg/Gly	0	3	—†	—†	—†
Gly/Gly	0	0	—†	—†	—†
Total	151	116			
<i>NQO1</i> , rs1800566					
Pro/Pro	103	77	Reference	—	—
Pro/Ser	44	37	1.12	0.66–1.91	0.662
Ser/Ser	4	2	0.67	0.12–3.75	0.647
Pro/Ser + Ser/Ser	48	39	1.09	0.65–1.82	0.751
Total	151	116			
<i>NQO2</i> , rs1143684					
Phe/Phe	93	81	Reference	—	—
Phe/Leu	53	29	0.63	0.37–1.08	0.093
Leu/Leu	5	6	1.38	0.40–4.68	0.608
Phe/Leu + Leu/Leu	58	35	0.69	0.41–1.16	0.162
Total	151	116			

*Crude OR.

†Significance could not be determined because of the absence of variants in both studied groups.

TABLE 4. Genotype Distribution According to Alcohol Drinker Status

Genotype	Controls	Cases	OR*	95% CI	P
Nondrinkers					
<i>SOD2</i> , rs4880					
Ala/Ala	14	14	Reference	—	—
Ala/Val	41	31	0.76	0.31–1.82	0.531
Val/Val	23	23	1.00	0.39–2.56	0.999
Ala/Val + Val/Val	64	54	0.84	0.37–1.92	0.686
Total	78	68			
<i>SOD3</i> , rs1799895					
Arg/Arg	76	66	Reference	—	—
Arg/Gly	2	2	1.15	0.16–8.40	0.889
Gly/Gly	0	0	—†	—†	—†
Total	78	68			
<i>NQO1</i> , rs1800566					
Pro/Pro	56	52	Reference	—	—
Pro/Ser	19	15	0.85	0.39–1.85	0.682
Ser/Ser	3	1	0.36	0.04–3.56	0.381
Pro/Ser + Ser/Ser	22	16	0.78	0.37–1.65	0.521
Total	78	68			
<i>NQO2</i> , rs1143684					
Phe/Phe	45	36	Reference	—	—
Phe/Leu	30	28	1.16	0.59–2.29	0.655
Leu/Leu	3	4	1.67	0.35–7.935	0.521
Phe/Leu + Leu/Leu	33	32	1.21	0.63–2.33	0.630
Total	78	68			
Occasional and current drinkers					
<i>SOD2</i> , rs4880					
Ala/Ala	44	29	Reference	—	—
Ala/Val	86	63	1.11	0.63–1.97	0.717
Val/Val	51	27	0.80	0.41–1.56	0.516
Ala/Val + Val/Val	137	90	1.00	0.58–1.71	0.581
Total	181	119			
<i>SOD3</i> , rs1799895					
Arg/Arg	180	116	Reference	—	—
Arg/Gly	1	3	4.66	0.48–45.29	0.185
Gly/Gly	0	0	—†	—†	—†
Total	181	119			
<i>NQO1</i> , rs1800566					
Pro/Pro	123	76	Reference	—	—
Pro/Ser	54	38	1.14	0.69–1.89	0.613
Ser/Ser	4	5	2.02	0.53–7.77	0.305
Pro/Ser + Ser/Ser	58	43	1.20	0.74–1.95	0.464
Total	181	119			
<i>NQO2</i> , rs1143684					
Phe/Phe	108	81	Reference	—	—
Phe/Leu	69	35	0.68	0.41–1.11	0.124
Leu/Leu	4	3	1.00	0.22–4.59	0.999
Phe/Leu + Leu/Leu	73	38	0.69	0.43–1.13	0.141
Total	181	119			

*Crude OR.

†Significance could not be determined because of the absence of variants in both studied groups.

Oxidative stress is associated with several pathological conditions including inflammation and infection.²⁶ An excess of oxidative stress above the physiological level important for cell signaling belongs to the generally suspected factors leading

to carcinogenesis.²⁶ Reactive oxygen species may be generated as byproducts of the metabolism of both endogenous and exogenous substrates, for example, tobacco smoke²⁷ or alcohol.²⁸ Pancreatic cancer risk has been linked to chronic pancreatitis,

TABLE 5. Genotype Distribution According to Coffee Drinker Status

Genotype	Controls	Cases	OR*	95% CI	P
Never or <3 cups per day					
<i>SOD2</i> , rs4880					
Ala/Ala	48	45	Reference	—	—
Ala/Val	106	92	0.93	0.56–1.52	0.759
Val/Val	62	59	1.01	0.59–1.73	0.957
Ala/Val + Val/Val	168	151	0.96	0.60–1.52	0.858
Total	216	196			
<i>SOD3</i> , rs1799895					
Arg/Arg	214	191	Reference	—	—
Arg/Gly	2	5	2.80	0.54–14.60	0.222
Gly/Gly	0	0	—†	—†	—†
Total	216	196			
<i>NQO1</i> , rs1800566					
Pro/Pro	149	138	Reference	—	—
Pro/Ser	62	54	0.94	0.61–1.45	0.780
Ser/Ser	5	4	0.86	0.23–3.28	0.830
Pro/Ser + Ser/Ser	67	58	0.93	0.61–1.42	0.753
Total	216	196			
<i>NQO2</i> , rs1143684					
Phe/Phe	122	122	Reference	—	—
Phe/Leu	90	66	0.73	0.49–1.10	0.133
Leu/Leu	4	8	2.00	0.59–6.82	0.268
Phe/Leu + Leu/Leu	94	74	0.79	0.53–1.17	0.235
Total	216	196			
≥3 Cups per day					
<i>SOD2</i> , rs4880					
Ala/Ala	11	4	Reference	—	—
Ala/Val	24	23	2.63	0.73–9.47	0.138
Val/Val	14	5	0.98	0.21–4.55	0.982
Ala/Val+Val/Val	38	28	2.03	0.58–7.03	0.266
Total	49	32			
<i>SOD3</i> , rs1799895					
Arg/Arg	48	31	Reference	—	—
Arg/Gly	1	1	1.58	0.10–25.68	0.760
Gly/Gly	0	0	—†	—†	—†
Total	49	32			
<i>NQO1</i> , rs1800566					
Pro/Pro	35	23	Reference	—	—
Pro/Ser	12	7	0.89	0.30–2.59	0.827
Ser/Ser	2	2	1.52	0.20–11.58	0.685
Pro/Ser + Ser/Ser	14	9	0.98	0.36–2.63	0.965
Total	49	32			
<i>NQO2</i> , rs1143684					
Phe/Phe	35	19	Reference	—	—
Phe/Leu	11	11	1.84	0.67–5.03	0.234
Leu/Leu	3	2	1.23	0.19–8.00	0.830
Phe/Leu + Leu/Leu	14	13	1.71	0.67–4.38	0.263
Total	49	32			

*Crude OR.

†Significance could not be determined because of the absence of variants in both studied groups.

TABLE 6. Genotype Distribution According to Tea Drinker Status

Genotype	Controls	Cases	OR*	95% CI	P
Never or <3 cups per day					
<i>SOD2</i> , rs4880					
Ala/Ala	58	48	Reference	—	—
Ala/Val	101	111	1.33	0.83–2.12	0.235
Val/Val	64	61	1.15	0.68–1.93	0.594
Ala/Val + Val/Val	165	172	1.26	0.81–1.95	0.302
Total	223	220			
<i>SOD3</i> , rs1799895					
Arg/Arg	220	214	Reference	—	—
Arg/Gly	3	6	2.06	0.51–8.33	0.312
Gly/Gly	0	0	—†	—†	—†
Total	223	220			
<i>NQO1</i> , rs1800566					
Pro/Pro	158	158	Reference	—	—
Pro/Ser	60	57	0.95	0.62–1.45	0.813
Ser/Ser	5	5	1.00	0.28–3.52	0.999
Pro/Ser + Ser/Ser	65	62	0.95	0.63–1.44	0.822
Total	223	220			
<i>NQO2</i> , rs1143684					
Phe/Phe	131	137	Reference	—	—
Phe/Leu	87	73	0.80	0.54–1.19	0.272
Leu/Leu	5	10	1.91	0.64–5.75	0.248
Phe/Leu + Leu/Leu	92	83	0.86	0.59–1.26	0.448
Total	223	220			
≥3 Cups per day					
<i>SOD2</i> , rs4880					
Ala/Ala	1	1	Reference	—	—
Ala/Val	29	4	0.14	0.01–2.67	0.190
Val/Val	12	3	0.25	0.01–5.26	0.373
Ala/Val + Val/Val	31	7	0.17	0.01–3.06	0.230
Total	42	8			
<i>SOD3</i> , rs1799895					
Arg/Arg	42	8	Reference	—	—
Arg/Gly	0	0	—†	—†	—†
Gly/Gly	0	0	—†	—†	—†
Total	42	8			
<i>NQO1</i> , rs1800566					
Pro/Pro	26	3	Reference	—	—
Pro/Ser	14	4	2.48	0.48–12.66	0.276
Ser/Ser	2	1	4.33	0.30–63.30	0.284
Pro/Ser + Ser/Ser	16	5	2.71	0.57–12.90	0.211
Total	42	8			
<i>NQO2</i> , rs1143684					
Phe/Phe	26	4	Reference	—	—
Phe/Leu	14	4	1.86	0.40–8.58	0.428
Leu/Leu	2	0	—†	—†	—†
Phe/Leu + Leu/Leu	16	4	1.62	0.36–7.42	0.531
Total	42	8			

Drinkers were divided to groups (never or <1 cup per day vs ≥1 cup per day) for the study of interactions with genotypes to achieve reasonable study power considering the genotype frequencies in the followed up groups.

*Crude OR.

†Significance could not be determined because of the absence of variants in both studied groups.

suggesting a role of inflammation in the disease etiology. Indeed, the tobacco smoke was experimentally proven to lead to pancreatic inflammation²⁹ through induction of oxidative

stress.³⁰ Moreover, it seems that β -cell dysfunction in human type 2 diabetes is also mediated by oxidative stress.³¹ Our previous study confirmed a positive personal history of pancreatitis (OR, 9.93; 95% CI, 2.63–37.52; $P < 0.001$) or diabetes (OR, 4.09; 95% CI, 1.95–8.55; $P < 0.001$) as a pancreatic cancer risk predictor.²⁵ However, neither alcohol alone nor polymorphisms in alcohol dehydrogenase ADH1B (OMIM, 103720) and ADH1C (OMIM, 103730) genes were associated with pancreatic cancer risk.²⁵ Therefore, the present study addressed the question whether polymorphisms in enzymes taking part in antioxidant capacity (SOD2 and SOD3) or mediating oxidative stress formation (NQO1 and NQO2) may be related to the risk of pancreatic carcinogenesis.

Genetic polymorphisms coding superoxide dismutases or quinone oxidoreductases with altered activity and/or stability were frequently studied as potential susceptibility factors in various cancers.^{32,33} However, pancreatic cancer generally belongs to the least studied cancers. Reduced antioxidant gene expression including SOD2 has been described in chronic pancreatitis and pancreatic cancer compared with the normal pancreas in controls.³⁴ Furthermore, Cullen et al³⁵ concluded that inhibition of NQO1 increases intracellular superoxide anion radical production and inhibits an in vitro malignant phenotype of pancreatic cancer. These mechanisms suggest that altering the intracellular redox environment of pancreatic cancer cells may inhibit growth and delineate a potential strategy directed against pancreatic cancer. Wheatley-Price et al¹⁹ reported the first association between pancreatic adenocarcinoma risk and polymorphisms in inflammatory pathway genes myeloperoxidase MPO (OMIM, 606989; G463A) and SOD2 (Ala16Val). Their results are in line with preclinical models of pancreatic carcinoma cell lines, where reduced SOD2 protein levels were correlated with increased rates of tumor cell proliferation.³⁶ Nevertheless, no significant association between SOD2 Ala16Val or the additionally studied SOD3 (Arg231Gly) functional polymorphisms and pancreatic cancer risk was found by the present study. Study design, for example, lower number of studied patients ($n = 122$, Wheatley-Price et al¹⁹), different structure of data used for adjusted analyses (in unadjusted analyses borderline significances, $P = 0.05$ and $P = 0.04$ were observed in dominant and recessive models, respectively¹⁹), or population-specific differences (US vs central European whites), may be among the possible reasons for disagreement between both studies. Because of this discrepancy, the elucidation of the role of superoxide dismutases in pancreatic cancer etiology will require validation in larger studies on homogeneous populations with well-defined environmental exposure. No association of the functionally relevant polymorphisms in NQO1 and NQO2 with pancreatic cancer risk was found as well. Our study thus confirmed the null results of a previously published small-sized explorative study on NQO1 rs1800566 polymorphism in pancreatic cancer and pancreatitis patients.³⁷ The association of polymorphisms in SOD3 and NQO2 with pancreatic cancer was never studied.

In conclusion, the first study evaluating the role of SOD2, SOD3, NQO1, and NQO2 polymorphisms in the pancreatic cancer etiology in the central European population with one of the highest incidences in the Western world did not find any association. It remains to be discovered whether other populations with different lifestyle(s) may be at risk.

REFERENCES

1. Cancer Incidence 2007 in the Czech Republic, IHIS CR, NOR CR, Czech Republic, 2010, ISSN 1210 857X.
2. Jamal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2008;58:71–96.
3. Lo AC, Soliman AS, El-Ghawalby N, et al. Lifestyle, occupational, and reproductive factors in relation to pancreatic cancer risk. *Pancreas.* 2007;35:120–129.
4. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA.* 1995;273:1605–1609.
5. Mukesh V. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat.* 2005;4:295–301.
6. Jiao L, Silverman DT, Schairer C, et al. Alcohol use and risk of pancreatic cancer: the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Epidemiol.* 2009;169:1043–1051.
7. Rohrmann S, Linseisen J, Vrieling A, et al. Ethanol intake and the risk of pancreatic cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control.* 2009;20:785–794.
8. Kiyohara C. Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer. *J Epidemiol.* 2000;10:349–360.
9. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer.* 1996;32A:30–38.
10. Hussain SP, Aguilar F, Amstad P, et al. Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene.* 1994;9:2277–2281.
11. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47–95.
12. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978;201:875–880.
13. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, et al. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226:561–565.
14. Wang Li, Miller DP, Sai Y, et al. Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1818–1821.
15. Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, et al. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis.* 2004;25:973–978.
16. Bergman M, Ahnström M, Palmebäck-Wegman P, et al. Polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene and risk of breast cancer in young women. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131:439–444.
17. Rajaraman P, Hutchinson A, Rothman N, et al. Oxidative response gene polymorphisms and risk of adult brain tumors. *Neuro Oncol.* 2008;10:709–715.
18. Woodson K, Tangrea JA, Lehman TA, et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland). *Cancer Causes Control.* 2003;14:513–518.
19. Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, et al. Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer.* 2008;112:1037–1042.
20. Wu K, Knox R, Sun XZ, et al. Catalytic properties of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2 (NQO2), a dihydronicotinamide riboside dependent oxidoreductase. *Arch Biochem Biophys.* 1997;347:221–228.
21. Asher G, Lotem J, Cohen B, et al. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1188–1193.
22. Siegel D, Anwar A, Winski SL, et al. Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol Pharmacol.* 2001;59:263–268.
23. Jamieson D, Wilson K, Pridgeon S, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and nrh:quinone oxidoreductase 2 activity and expression in bladder and ovarian cancer and lower NRH:quinone oxidoreductase 2 activity associated with an NQO2 exon 3 single-nucleotide polymorphism. *Clin Cancer Res.* 2007;13:1584–1590.

24. Lyn-Cook BD, Yan-Sanders Y, Moore S, et al. Increased levels of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in pancreatic tissues from smokers and pancreatic adenocarcinomas: a potential biomarker of early damage in the pancreas. *Cell Biol Toxicol.* 2006;22:73–80.
25. Mohelnikova-Duchonova B, Vrana D, Holcatova I, et al. CYP2A13, ADH1B and ADH1C gene polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas.* 2010;39:144–148.
26. Khandrika L, Kumar B, Koul S, et al. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2009;282:125–136.
27. Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res.* 2009;674:36–44.
28. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res.* 2005;569:101–110.
29. Wittel UA, Pandey KK, Andrianifahanana M, et al. Chronic pancreatic inflammation induced by environmental tobacco smoke inhalation in rats. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:148–159.
30. Hao J, Li G, Pang B. Evidence for cigarette smoke-induced oxidative stress in the rat pancreas. *Inhal Toxicol.* 2009;21:1007–1012.
31. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005;54:727–735.
32. Kang D, Lee KM, Park SK, et al. Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:1581–1586.
33. Vineis P, Veglia F, Garte S, et al. Genetic susceptibility according to three metabolic pathways in cancers of the lung and bladder and in myeloid leukemias in nonsmokers. *Ann Oncol.* 2007;18:1230–1242.
34. Cullen JJ, Mitros FA, Oberley LW. Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas.* 2003;26:23–27.
35. Cullen JJ, Hinkhouse MM, Grady M, et al. Dicumarol inhibition of NADPH:quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism. *Cancer Res.* 2003;63:5513–5520.
36. Cullen JJ, Weydert C, Hinkhouse MM, et al. The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:1297–1303.
37. Bartsch H, Malaveille C, Lowenfels AB, et al. Genetic polymorphism of *N*-acetyltransferases, glutathione *S*-transferase M1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in relation to malignant and benign pancreatic disease risk. The International Pancreatic Disease Study Group. *Eur J Cancer Prev.* 1998;7:215–223.

Příloha č. 3

Vrana D, Pikhart H, **Mohelnikova-Duchonova B**, Holcatova I, Strnad R, Slamova A, Schejbalova M, Ryska M, Susova S, Soucek P.

The association between glutathione S-transferase gene polymorphisms and pancreatic cancer in a central European Slavonic population.

Mutat Res. **2009**;680(1-2):78-81. (IF₂₀₁₂ = 2,9)



Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gen tox
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Short communication

The association between glutathione S-transferase gene polymorphisms and pancreatic cancer in a central European Slavonic population

D. Vrana^{a,b}, H. Pikhart^c, B. Mohelnikova-Duchonova^{a,d}, I. Holcatova^e, R. Strnad^f,
 A. Slamova^e, M. Schejbalova^e, M. Ryska^f, S. Susova^a, P. Soucek^{a,*}

^a Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42, Czech Republic^b Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine and Department of Oncology of the General Teaching Hospital, Czech Republic^c International Institute for Society and Health, Department of Epidemiology and Public Health, University College London, UK^d Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine, Czech Republic^e Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine, Institute of Hygiene and Epidemiology, Czech Republic^f Charles University in Prague, 2nd Faculty of Medicine and Central Military Hospital, Surgery Department, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2009

Received in revised form 28 August 2009

Accepted 4 September 2009

Available online 26 September 2009

Keywords:

Glutathione S-transferases

Pancreas

Cancer

Risk

ABSTRACT

In the first case-control study on pancreatic cancer conducted on 253 cases and 403 controls in the Czech Republic we observed that the *GSTP1*-codon 105 Val variant allele and the *GSTT1*-null genotype were associated with an elevated risk for pancreatic cancer (OR = 1.38; 95%CI = 0.96–1.97 and OR = 1.56; 95%CI = 0.93–2.61, respectively). Combination of *GSTT1*-null and *GSTP1*-codon 105 Val variants further increased the risk for pancreatic cancer (OR = 2.50; 95%CI = 1.20–5.20). In conclusion, this study suggests population-specific associations of polymorphisms in key biotransformation genes with elevated risk for pancreatic cancer.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The incidence of pancreatic cancer (ICD-10: C25) in the Czech Republic reached a total of 15.4 cases per 100,000 inhabitants in 2005 [1]. The majority of these cases are clinically silent until symptoms arise, such as dyspepsia, weight loss, epigastric pain radiating into the back, and jaundice. Despite significant efforts in therapy, the 5-year survival rate does not surpass 5% [2]. Pancreatic cancer rarely occurs in the young population. Most often it affects individuals between 45 and 85 years of age. Because of its growing incidence and high fatality rate, there is a strong need to identify risk factors that contribute to the onset of the disease. Approximately 4–16% of pancreatic cancers are attributed to a genetic predisposition (familial cases) due to germ-line mutations in highly penetrant genes [3]. These mutations involve genes contributing to the regulation of the cell cycle, tumor-suppressor genes as well as proto-oncogenes, such as *BRCA1/2* or *CDKN2A*, *CDKN2B*, etc. Nevertheless, the majority of pancreatic cancer cases occur in individuals without a prior family history (sporadic cases). Published risk factors include age, sex, diabetes, obesity, history of chronic pancreatitis, diet rich in

fat, tobacco, and infection by *Helicobacter pylori* [4,5]. Metabolism of environmentally important contaminants (both activation of pre-carcinogens and detoxification of carcinogens) may present an important susceptibility factor as well. Polymorphisms in genetically variable xenobiotic-metabolizing enzymes may modify the risk for carcinogenesis [6].

Glutathione S-transferases (GST, EC 2.5.1.18) *GSTM1* (OMIM: 138350), *GSTP1* (OMIM: 134660) and *GSTT1* (OMIM: 600436) are frequently studied in molecular epidemiology of cancer. Large genomic deletions of *GSTM1* and *GSTT1* (null genotype) produce a complete lack of enzyme activities. *GSTP1* polymorphism (Ile105Val, rs1695) generates an enzyme with different heat stability and substrate affinity [7]. *GSTP1* variants confer a possibly protective effect against pancreatic cancer in older individuals and a significant survival advantage in patients who received 5-fluorouracil [8]. Results of Ferraz et al. suggested that *GSTT1* and *GSTP1* could play a role in the occurrence of *TP53* mutations in colorectal cancer [9]. An interaction was reported between *XRCC1* (OMIM: 194360; Arg399Gln, rs25487) and *GSTT1/GSTM1-null/null* [10], and between *GSTT1-null* and cigarette smoking, which was more prominent among women than among men with pancreatic cancer [11].

In this study we evaluated whether *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* polymorphisms influence the risk for pancreatic cancer in a case-control study conducted in the Czech Republic, in a central

* Corresponding author. Tel.: +420 267082711; fax: +420 267311236.
 E-mail address: psoucek@szu.cz (P. Soucek).

European, predominantly Slavonic population. Special attention was paid to the effect of gene combinations, age, sex, and smoking status.

2. Patients and methods

2.1. Study population

The association between pancreatic cancer risk and genetic polymorphisms was investigated in a case-control study. A total of 768 participants were recruited in the period between September 2004 and February 2008. Cases were incident pancreatic cancer patients from five oncology and surgery departments in Prague. Pancreatic cancer diagnosis was periodically reconfirmed. Patients were eligible for the study when they fulfilled at least one of the following criteria: (a) histologically or cytologically confirmed pancreatic adenocarcinoma or (b) at least three of the clinical signs of pancreatic cancer (ERCP, EUS with FNAB, mass on CT or MRI, weight loss, anorexia/cachexia, obstructive jaundice). Among cases, there were 136 patients with histological verification and 117 patients with clinically verified diagnosis. Thirty-eight other patients (potential cases) were excluded from the study due to other than pancreatic cancer diagnosis (15 individuals with pancreatitis and 23 individuals with other diagnoses). Seven further cases were excluded as variables needed for the analysis (such as age) were not available to the investigators. Randomly selected controls were healthy individuals from two independent groups: 179 healthy subjects recruited by general practitioners in Prague during the same period as the case recruitment, and 224 blood donors from two centers, in Prague and Pribram. Controls had a similar sex and age distribution as cases. Personal data were collected by face-to-face interview using a structured questionnaire (data such as short occupational history, smoking habits, education, reproductive history and nutritional information). In addition, clinical data were collected from medical records (date of diagnosis, stage, grade and histology where available). Sixty-seven controls were excluded because variables needed for the analysis were missing. At the end of study period we had 253 cases and 403 controls included into the study, for whom blood samples and filled questionnaires were available. Written informed consent to participate in the study was obtained from all participants. The study was approved by the Ethical Committee of the 1st Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic.

2.2. Genotyping

Blood was collected during diagnostic procedures using tubes with K₃EDTA anticoagulant. DNA was isolated from lymphocytes using the phenol/chloroform extraction method as described earlier [12]. The *GSTP1*-codon 105 polymorphism was assayed by use of allelic discrimination with the TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay (rs1695, kit no.: C.3237198.20, Applied Biosystems, Foster City, CA) with real-time PCR in RotorGene 6000 (Corbett Research, Brisbane, Australia). Determination was performed according to instructions provided by the manufacturer (Applied Biosystems). Deletion polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* were assessed by allele-specific multiplex PCR [13]. Quality control was performed by reanalysis of 10% randomly selected samples. Results were fully concordant. Oligonucleotide primers for *GSTM1* and *GSTT1* analyses were synthesized by Generi Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic). Genotyping could not be done on all subjects: data on *GSTM1* were available for 253 cases and 403 controls, on *GSTP1* for 253

cases and 402 controls, and on *GSTT1* for 244 cases and 347 controls. Unsuccessful genotyping of *GSTT1* was caused by inadequate quality or quantity of DNA (lack of control PCR product).

2.3. Statistical analysis

Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) for examining the association between genetic factors and cancer risk were estimated by logistic regression. Age, sex, smoking status (current smoker, past smoker, never smoker) and education (primary or less, vocational, secondary, higher) were used as potential confounding factors or effect modifiers (interaction term used in the regression model) in adjusted analysis. Potential gene-gene interactions were tested in a further step. The likelihood-ratio test was used to test the significance of the main effects, potential effect modifications and gene-gene interactions. For each analysis (depending on the genetic variable/s used) the maximal dataset was used, including all available data were used. A two-sided $p < 0.05$ would be considered significant. All analyses were conducted with Stata 10 software (Stata Corp, TX, USA).

3. Results

There were 253 cases and 403 controls aged 25 years and older in the dataset (age range 25–87 years). The main characteristics of the study population are presented in Table 1. There were no significant differences in age and sex distribution between cases and controls.

The *GSTP1*-codon 105 Val allele and the *GSTT1*-null genotype were associated with increased pancreatic cancer risk in unadjusted analyses (results not shown). Because no statistically significant heterogeneity was found, both control groups were pooled together for further analysis. In Table 2 the results are given for all subjects and for younger and older individuals separately. While the interaction between genotypes and age was not significant (p -values 0.15, 0.61 and 0.99 for age interaction with *GSTP1*, *GSTT1* and *GSTM1*, respectively), the magnitude of the effect seems to differ by age. In particular, the effect of the combination *GSTT1*-*GSTP1* seems to differ per age group, being stronger in subjects younger than 50 years (however, the p -value for interaction with age is 0.47). In addition, it seems possible that the effect of *GSTT1*-*GSTP1* among individuals younger than 50 years differs by sex: the odds ratio (OR) for null-Ile/Val or null-Val/Val combination vs. present-Ile/Ile combination is 2.35 in men and 7.36 in women, but the numbers are small and neither the main effects nor the interaction are statistically significant (results not shown). No statistically significant interaction of the studied polymorphisms with smoking was found (while the main effect of smoking was borderline significant with an OR between 1.4 and 1.7 depending on genotype used

Table 1
Descriptive characteristics of the study groups.

Characteristics		Total	Cases	Controls	P -value*
		N (%)	N (%)	N (%)	
Age	<40 years	114 (17.4)	40 (15.9)	74 (18.3)	<0.001
	40–50	126 (19.2)	22 (8.7)	104 (25.7)	
	50–60	173 (26.4)	48 (19.1)	125 (30.9)	
	60–70	149 (22.7)	86 (34.1)	63 (15.6)	
	70–80	68 (10.4)	44 (17.5)	24 (5.9)	
	80+	26 (4.0)	12 (4.8)	14 (3.5)	
Sex	Men	410 (61.6)	156 (61.9)	254 (62.9)	0.85
	Women	246 (38.4)	96 (38.1)	150 (37.1)	
Smoking status	Never	244 (37.2)	83 (32.9)	161 (39.9)	<0.001
	Past smoker	193 (29.4)	71 (28.2)	122 (30.2)	
	Current smoker	171 (26.1)	57 (22.6)	114 (28.2)	
	Status unknown	48 (7.3)	41 (16.3)	7 (1.7)	
Education	Primary or less	111 (15.2)	63 (24.2)	48 (10.2)	<0.001
	Vocational	225 (30.8)	70 (26.9)	155 (33.0)	
	Secondary	260 (35.6)	69 (26.5)	191 (40.6)	
	Higher	112 (15.3)	42 (16.2)	70 (14.9)	
	Unknown	22 (3.0)	16 (6.2)	6 (1.3)	

* Chi-square test for the association between exposure and outcome.

Table 2
Glutathione S-transferases and age interaction in pancreatic cancer (only subjects with complete data).

Gene/genotype	Cases, N (%)	Controls, N (%)	All subjects OR (95%CI) ^a	<50 years		≥50 years	
				N	OR (95%CI) ^a	N	OR (95%CI) ^a
<i>GSTM1</i>							
Present	115 (45.5)	188 (46.7)	1.00 (reference)	114	1.00 (reference)	189	1.00 (reference)
Null	138 (54.6)	215 (53.4)	0.92 (0.64–1.31)	125	0.85 (0.39–1.89)	228	0.90 (0.59–1.36)
N total	253	403					
<i>GSTT1</i>							
Present	199 (81.6)	308 (88.8)	1.00 (reference)	181	1.00 (reference)	326	1.00 (reference)
Null	45 (18.4)	39 (11.2)	1.56 (0.93–2.61)	27	1.13 (0.33–3.93)	57	1.66 (0.91–3.04)
N total ^b	244	347					
<i>GSTP1</i> -codon 105							
Ile/Ile	100 (39.5)	192 (47.8)	1.00 (reference)	116	1.00 (reference)	176	1.00 (reference)
Ile/Val or Val/Val	153 (60.5)	210 (52.2)	1.38 (0.96–1.97)	123	3.09 (1.25–7.63)	240	1.23 (0.81–1.87)
N total ^b	253	402					
<i>GSTT1</i> - <i>GSTP1</i> interaction							
Present-Ile/Ile	76 (31.3)	146 (42.1)	1.00 (reference)	89	1.00 (reference)	133	1.00 (reference)
Null-Ile/Ile	18 (7.4)	21 (6.0)	1.46 (0.97–2.18)	13	0.77 (0.10–5.67)	26	1.69 (0.69–4.13)
Present-Ile/Val or Val/Val	123 (50.6)	162 (46.7)	1.46 (0.69–3.12)	92	3.00 (1.15–7.82)	193	1.31 (0.81–2.09)
Null-Ile/Val or Val/Val	26 (10.7)	18 (5.2)	2.50 (1.20–5.20)	14	4.40 (0.79–24.7)	30	2.21 (0.95–5.15)
N total ^b	243	347					

^a Adjusted for age, sex, smoking status and education.

^b Missing genotypes due to inadequate quality or quantity of DNA.

in the analysis). When adjusted for education, the results remained virtually unchanged.

4. Discussion

Pancreatic cancer has typically a poor prognosis and a very high mortality. The etiology and molecular pathogenesis of this cancer are still poorly understood. Besides alterations of high-penetrance genes, interaction of environmental factors with low-penetrance genes is suspected to contribute to the onset of pancreatic cancer. We aimed to investigate the contribution of well-characterized and functionally relevant polymorphisms in *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* to susceptibility to pancreatic cancer. To this end, a case-control study was conducted among a central-European population with one of the highest incidences of this type of cancer in the western world. Age and smoking, the published strong risk factors for pancreatic cancer [14,15] were followed as possible interacting factors.

Although the *GSTM1*-null genotype is a suspected risk factor in lung cancer [16], according to our results it is unlikely that it influences the risk for pancreatic cancer. Our observation is in concordance with previously published studies [8,10,17].

We observed that the *GSTP1*-codon 105 Val variant allele was associated with elevated pancreatic cancer risk (3.09-fold) in individuals younger than 50 years of age. Our study supports the previously proposed role of *GSTP1* polymorphism in pancreatic pathogenesis [8]. However, Jiao et al. suggested that individuals aged 62 years or older who carried the *GSTP1**C (codon 105 Val-codon 114 Val)-containing genotype tended to have a reduced risk compared with younger individuals who carried the non-*C genotype (OR=0.54, CI=0.29–1.02, ref. [8]). Thus, there is a clear discrepancy between both studies: we found an association of *GSTP1*-codon 105 with pancreatic cancer risk in individuals younger than 50 years, but Jiao et al. found association in individuals aged 62 or older. Both observations may be result of small sample sizes, effect of other genes and/or genotypes not analyzed in these studies, or a different study design.

We found that the *GSTT1*-null genotype was associated with an increased risk for pancreatic cancer (1.56-fold, non-significant) in

the adjusted analyses. This effect was evident in individuals aged 50 or older (1.66-fold, non-significant) but not in younger subjects. The first study of this kind found no association of *GSTT1*-null with pancreatic cancer [17]. However, Duell et al. suggested that the combination of heavy smoking and a deletion polymorphism in *GSTT1* is associated with an increased risk for pancreatic cancer among Caucasians, with the association possibly being stronger in women than in men [11]. In our study, smoking did not interact with any of the genes studied, both in adjusted and stratified analyses.

The combination of *GSTT1* and *GSTP1* had a multiplicative effect on the risk for pancreatic cancer, the association being significant when all subjects were analyzed together (OR, 2.5). There is no statistical evidence for a departure from multiplicativity of the association (*p*-value 0.76 for gene–gene interaction).

Our study has a limitation in the fact that although our time for data collection was long, the sample size is still relatively small. The power of the study for gene–gene interactions and stratified analyses was low and it can be assumed that the probability of chance findings in these analyses was quite high. It is essential to use multi-centric design in the future to collect data on large numbers of cases for such analysis. Among other limitations, the presumed genetic variability and phenotypic heterogeneity of tumors in patient populations should be mentioned. A study of a homogeneous (at least pathologically) population of patients is, however, almost impossible due to the difficulties with recruitment of pancreatic cancer cases with a rather short survival and poor performance status. Additionally, in inoperable patients (the majority in pancreatic cancer) the verification of diagnosis is complicated by the lack of a pathological specimen. In our study, familial cases based on family history were not distinguished from sporadic cases. However, due to the fact that familial pancreatic cancer is very rare, it is unlikely that the unknown hereditary genetic background of patients would have had a high impact on the study findings.

To our knowledge we here present the first study that evaluates the role of GST polymorphisms in pancreatic cancer in a Slavonic population. Conflicting results in comparison with few published

data warrant further research and similar studies in related populations of Caucasian origin.

Conflict of interest

None.

Acknowledgement

This work was supported by the Grant Agency of the Ministry of Health Czech Republic, grants No. 8563-5 and 9422-3.

References

- [1] Cancer Incidence 2005 in the Czech Republic, IHIS CR, NOR CR, Czech Republic 2008, p. 62.
- [2] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, et al., Cancer statistics, 2008, *CA Cancer J. Clin.* 58 (2008) 71–96.
- [3] A. Maitra, R.H. Hruban, Pancreatic cancer, *Annu. Rev. Pathol.* 3 (2008) 157–188.
- [4] J. Everhart, D. Wright, Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A: metaanalysis, *JAMA* 273 (1995) 1605–1609.
- [5] V. Mukesh, Pancreatic cancer epidemiology, *Technol. Cancer Res. Treat.* 4(2005) 295–301.
- [6] C. Kiyohara, Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer, *J. Epidemiol.* 10 (2000) 349–360.
- [7] P. Zimniak, B. Nanduri, S. Pikula, J. Bandorowicz-Pikula, Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties, *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 893–899.
- [8] L. Jiao, M.L. Bondy, M.M. Hassan, et al., Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk and survival of pancreatic cancer, *Cancer* 109 (2007) 840–848.
- [9] J.M. Ferraz, F. Zinzindohoué, T. Lecomte, et al., Impact of GSTT1, GSTM1, GSTP1 and NAT2 genotypes on KRAS2 and TP53 gene mutations in colorectal cancer, *Int. J. Cancer* 110 (2004) 183–187.
- [10] E.J. Duell, E.A. Holly, P.M. Bracci, J.K. Wiencke, K.T. Kelsey, A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) and risk of pancreatic adenocarcinoma, *Cancer Res.* 62 (2002) 4630–4636.
- [11] E.J. Duell, E.A. Holly, P.M. Bracci, M. Liu, J.K. Wiencke, K.T. Kelsey, A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk, *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (2002) 297–306.
- [12] H. Sugimura, N.E. Caporaso, G.L. Shaw, et al., Human debrisoquine hydroxylase gene polymorphisms in cancer patients and controls, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1527–1530.
- [13] V. Nedelcheva-Kristensen, T.I. Andersen, B. Erikstein, et al., Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients, *Pharmacogenetics* 8 (1998) 441–447.
- [14] A.R. Hart, H. Kennedy, I. Harvey, Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6 (2008) 275–282.
- [15] R. Lochan, A.K. Daly, H.L. Reeves, R.M. Charnley, Genetic susceptibility in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Br. J. Surg.* 95 (2008) 22–32.
- [16] C. Carlsten, G.S. Sagoo, A.J. Frodsham, W. Burke, J.P. Higgins, Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGE review and meta-analysis, *Am. J. Epidemiol.* 167 (2008) 759–774.
- [17] G. Liu, P. Ghadirian, D. Vesprini, et al., Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 and risk of pancreatic adenocarcinoma, *Br. J. Cancer* 82 (2000) 1646–1649.

Příloha č. 4

Mohelnikova-Duchonova B, Havranek O, Hlavata I, Foretova L, Kleibl Z, Pohlreich P,
Soucek P.

CHEK2 gene alterations in the forkhead-associated domain, 1100delC and del5395 do not modify the risk of sporadic pancreatic cancer.

Cancer Epidemiol. **2010**;34(5):656-8. (IF2012 = 1,2)



CHEK2 gene alterations in the forkhead-associated domain, 1100delC and del5395 do not modify the risk of sporadic pancreatic cancer

Beatrice Mohelnikova-Duchonova^{a,b,1}, Ondrej Havranek^{c,1}, Ivona Hlavata^a, Lenka Foretova^d, Zdenek Kleibl^e, Petr Pohlreich^e, Pavel Soucek^{a,*}

^aToxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42, Prague 10, Czech Republic

^b1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Kateřinská 32, 121 08, Prague 2, Czech Republic

^c1st Department of Internal Medicine - Department of Haematology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, U Nemocnice 2, 128 08, Prague 2, Czech Republic

^dDepartment of Cancer Epidemiology and Genetics, Masaryk Memorial Cancer Institute, Zlutý kopec 7, 656 53, Brno, Czech Republic

^eInstitute of Biochemistry and Experimental Oncology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, 128 53, Prague 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 20 June 2010

Keywords:
Checkpoint kinase 2
Alterations
Deletion
Pancreatic cancer
Risk

ABSTRACT

Checkpoint kinase 2 gene (*CHEK2*) alterations increase risk of several cancer types. We analyzed selected *CHEK2* alterations in 270 Czech pancreatic cancer patients and in 683 healthy controls. The pancreatic cancer risk was higher in individuals who inherited rare alterations in *CHEK2* region involving forkhead-associated domain other than I157T (OR = 5.14; 95% CI = 0.94–28.23) but the observed association was non-significant ($p = 0.057$). The most frequent I157T mutation did not alter the pancreatic cancer risk and neither the followed deletion of 5395 bp nor c.1100delC were found in any of pancreatic cases. We conclude that the I157T, other alterations in its proximity, del5395 and c.1100delC in *CHEK2* do not predispose to pancreatic cancer risk in the Czech population.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pancreatic carcinoma (OMIM: 260350) is the fourth leading cause of cancer-related deaths in the Czech Republic with a 5-year survival rate less than 5% [1,2]. The majority of genetic changes, identified in ductal pancreatic adenocarcinoma target the core intracellular signaling pathways including apoptosis, cell cycle and also DNA repair [3].

Checkpoint kinase 2 (*CHEK2*, *CHK2*, OMIM 604373) is a nuclear phosphoprotein involved primarily in DNA repair signaling and hence genome integrity maintenance, however, its activities also contribute to cell cycle regulation, apoptosis and senescence [4]. Mutation analyses have been indicating that *CHEK2* acts as a multiorgan cancer susceptibility low or moderate penetrant gene modifying the risk of sporadic and/or familial breast, colorectal, prostate, ovarian, thyroid, kidney and lung cancers [5–8]. The role of *CHEK2* in sporadic pancreatic cancer development has not been studied so far, however, it has been shown that the risk of pancreatic cancer development is increased in several hereditary cancer syndromes resulting from inherited mutations in genes

directly involved in DNA repair pathways (e.g. *BRCA1*, *BRCA2*) [9]. Our previous studies on the Czech population have shown significant associations of alterations flanking to or localized within the *CHEK2* forkhead-associated (FHA) domain-coding region (residues 112–175; containing the most prevalent *CHEK2* mutation – I157T) with the increased risk of sporadic colorectal but not breast cancer [10,11].

We aimed to assess the relevance of the previously identified cancer risk-modifying *CHEK2* alterations including alterations encompassing the FHA domain-coding region, c.1100delC mutation, and the large genomic deletion of 5395 bp (del5395) in exons 8 and 9 [12] for pancreatic cancer risk in the Czech population.

2. Patients and methods

2.1. Subjects

A total of 953 individuals of Czech Caucasian ancestry were included into the study in the period between January 2003 and February 2009. The cases included 270 incident pancreatic cancer patients. The design, eligibility criteria, and characteristics of the cases were described in detail previously [13].

Randomly selected controls represented 683 unrelated non-cancer individuals from the same catchments area as the cases. Characteristics and recruitment criteria of the control group

* Corresponding author. Tel.: +420 26708 2711, fax: +420 26731 1236.
E-mail address: psoucek@szu.cz (P. Soucek).

¹ These authors contributed equally to this work.

Table 1
Identified alterations in sequence surrounding the *CHEK2* FHA domain.

	Cases, N (%)	Controls, N (%)	OR ^a	95% CI ^a	p ^a
No alterations ^b	259 (96.3)	664 (97.2)	Reference (1.00)		
c.470T>C (I157T)	6 (2.2)	17 (2.5)	0.89	0.35–2.29	0.815
c.538C>T (R180C)	0	1 (0.1)	–	–	–
IVS1-5T>A	1 (0.4)	0	–	–	–
IVS2+24C>T	1 (0.4)	1 (0.1)	–	–	–
IVS2+1G>A (fs154X)	1 (0.4)	0	–	–	–
IVS2-55C>T	1 (0.4)	0	–	–	–
Alterations excluding I157T	4 (1.5)	2 (0.3)	5.14	0.94–28.23	0.057
All alterations	10 (3.7)	19 (2.8)	1.35	0.62–2.94	0.451

^a Common odds ratio (OR) estimate with 95% confidence interval (CI) and significance p by 2-sided Fisher's Exact Test.

^b Alterations were not determined in one case due to the absence of PCR product in the sample.

including the results of mutation analysis of *CHEK2* FHA domain, del5395, and c.1100delC were previously described [11,12,14].

All participants gave their informed written consent to participate in the study approved by the Ethical Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic.

2.2. Mutation analyses

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by published protocols [13,14]. The analyses of *CHEK2* alterations in FHA domain-coding exons 2 and 3 (with adjacent intronic sequences of introns 1 and 3 and whole sequence of intron 2) and the c.1100delC mutation were based on denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC WAVE system 3500) and sequencing of samples with aberrant chromatograms, whereas the del5395 mutation was resolved by fragment analysis of long-range PCR products on agarose gel electrophoresis as we described in details recently [11,12,14].

2.3. Statistical analyses

Two-sided Fisher's Exact Test was used for evaluation of significance of results. Crude odds ratios (OR) were calculated from 2 × 2 tables by unconditional Mantel–Haenszel statistics using Win SPSS v 15.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

We analyzed the impact of *CHEK2* alterations to the development of sporadic pancreatic cancer in 270 Czech patients. The c.470T>C (p.I157T) mutation affecting the FHA-coding domain was the most prevalent *CHEK2* alteration in pancreatic cancer cases found in six out of 269 analyzed cases (2.2%). However, this frequency was similar to that noted in controls (2.5%) resulting in non-significant association with the pancreatic cancer risk ($p = 0.815$; Table 1). The occurrence of other alterations within the *CHEK2* FHA domain-coding sequence (IVS2+1G>A) or those localized in its proximity (IVS1-5T>A, IVS2+24C>T, IVS2-55C>T, c.538C>T) was in our study higher among cases (4/269; 1.5%) compared to controls (2/683; 0.3%) but the association with the pancreatic cancer risk was non-significant ($p = 0.057$; Table 1). All four intronic alterations characterized in this *CHEK2* fragment were described previously in breast and/or colorectal cancer cases from the Czech Republic [10,11]. Except the mutation IVS2+1G>A demonstrably altering the CHK2 protein structure (fs154X), the biological relevance of the others remains unknown *in vivo*. Based on computer prediction, we previously deduced that intronic variants IVS1-5T>A and IVS2+24C>T may interfere with binding of splicing factors [11], whereas IVS2-55C>T may affect the most probable branching site [10]. The c.538C>T (R180C) found in one control individual occurs in the less conservative coding sequence flanking to C-terminal

proportion of the FHA domain and it has been described previously in several cancer patients representing rare, probably neutral polymorphism [10]. Analyses of other *CHEK2* hot-spot regions in our set of pancreatic cancer patients revealed no carrier of either *CHEK2* c.1100delC mutation or the del5395 (described as Czech founder mutation in breast cancer cases) [12]. The frequency of c.1100delC in the Czech population is low (0.3%) and our results indicate that this alteration unlikely contributes to the sporadic pancreatic cancer development [14]. One heterozygote carrier of del5395 was previously identified in the control group only (1/565; 0.2%) and thus the del5395 remains relevant exclusively for breast cancer families [11,12]. However, the overall number of detected variants in our study was relatively small, and some associations may have been missed as a result of limited study power.

The role of *CHEK2* alterations in sporadic pancreatic cancer has not been studied so far. Bartsch et al. identified one 1100delC mutation carrier among 35 German familial cancer patients and suggested a possible contribution of this alteration to onset of familial pancreatic cancer [15]. Miyasaka et al. indicated that DNA damage checkpoint activation occurs at an early stage of intraductal papillary mucinous neoplasms of pancreas (IPMNs) and prevents their progression [16]. Disturbance of this pathway due to CHK2 inactivation or *TP53* mutation was suggested to contribute to carcinogenesis of IPMNs.

Due to the limited sample size, the effect of familial etiology could not have been discerned but it remains an interesting task for future studies as the I157T was recently demonstrated to positively associate (OR = 2.1; $p = 0.0004$) with mismatch repair-negative hereditary non-polyposis colorectal cancer in Polish population [17].

In conclusion, our data suggest that in contrary to breast and colorectal cancers, alterations in the *CHEK2* FHA domain-coding region, c.1100delC and del5395 do not significantly modify the risk in sporadic pancreatic cancer.

Conflict of interest statement

None declared.

Financial support

This work was supported by grants of Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, no.: 9029-4 and 9799-4, Ministry of Health Project MZO MOU 2005 and the Ministry of Education Youth and Sports Research Project: MSM0021620808.

Acknowledgements

Authors wish to thank Ivana Holcatova, MD, PhD from Institute of Hygiene and Epidemiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital, Czech Republic, Prof. Miroslav Ryska, MD, PhD from Department of Surgery, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and

Central Military Hospital, Czech Republic and their co-workers for recruitment of patients and clinical data into the study.

References

- [1] Cancer Incidence 2006 in the Czech Republic. Czech Republic: IHIS CR, NOR CR, 2009. p. 62.
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225–49.
- [3] Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008;321:1801–6.
- [4] Nevanlinna H, Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* 2006;25:5912–9.
- [5] Cybulski C, Górski B, Huzarski T, Masojć B, Mierzejewski M, Dębniak T, et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004;75:1131–5.
- [6] Brennan P, McKay J, Moore L, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, et al. Uncommon CHEK2 mis-sense variant and reduced risk of tobacco-related cancers: case control study. *Hum Mol Genet* 2007;16:1794–801.
- [7] Seppälä EH, Ikonen T, Mononen N, Autio V, Rökman A, Matikainen MP, et al. CHEK2 variants associate with hereditary prostate cancer. *Br J Cancer* 2003;89:1966–70.
- [8] Thompson D, Seal S, Schutte M, McGuffog L, Barfoot R, Renwick A, et al. A multicenter study of cancer incidence in CHEK2 1100delC mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2542–5.
- [9] Kim DH, Crawford B, Ziegler J, Beattie MS. Prevalence and characteristics of pancreatic cancer in families with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer* 2009;8:153–8.
- [10] Kleibl Z, Havranek O, Novotny J, Kleiblova P, Soucek P, Pohlreich P. The CHEK2 gene I157T mutation and other alterations in its proximity increase the risk of sporadic colorectal cancer in the Czech population. *Eur J Cancer* 2009;45:618–24.
- [11] Kleibl Z, Havranek O, Novotny J, Kleiblova P, Soucek P, Pohlreich P. Analysis of CHEK2 FHA domain in Czech patients with sporadic breast cancer revealed distinct rare genetic alterations. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112:159–64.
- [12] Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 2006;295:1379–88.
- [13] Mohelnikova-Duchonova B, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z, Soucek P. CYP2A13, ADH1B and ADH1C gene polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas* 2010;39:144–8.
- [14] Kleibl Z, Novotny J, Bezdickova D, Malik R, Kleiblova P, Foretova L, et al. The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic. *Breast Cancer Res Treat* 2005;90:165–7.
- [15] Bartsch DK, Krysewski K, Sina-Frey M, Fendrich V, Rieder H, Langer P, et al. Low frequency of CHEK2 mutations in familial pancreatic cancer. *Fam Cancer* 2006;5:305–8.
- [16] Miyasaka Y, Nagai E, Yamaguchi H, Fujii K, Inoue T, Ohuchida K, et al. The role of the DNA damage checkpoint pathway in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Clin Cancer Res* 2007;13:4371–7.
- [17] Suchy J, Cybulski C, Wokołorczyk D, Oszurek O, Górski B, Dębniak T, et al. CHEK2 mutations and HNPCC – related colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010;126:237–42.

Příloha č. 5

Hlavata I, Vrana D, Smerhovský Z, Pardini B, Naccarati A, Vodicka P, Novotný J,
Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P.

**Association between exposure-relevant polymorphisms in CYP1B1, EPHX1, NQO1,
GSTM1, GSTP1 and GSTT1 and risk of colorectal cancer in a Czech population.**

Oncol Rep. 2010;24(5):1347-53. (IF₂₀₁₂ = 1,7)

Association between exposure-relevant polymorphisms in *CYP1B1*, *EPHX1*, *NQO1*, *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* and risk of colorectal cancer in a Czech population

IVONA HLAVATA^{1,2}, DAVID VRANA^{1,3,5}, ZDENEK SMERHOVSKY^{1,6},
BARBARA PARDINI⁷, ALESSIO NACCARATI⁷, PAVEL VODICKA⁷, JAN NOVOTNY⁴,
BEATRICE MOHELNIKOVA-DUCHONOVA^{1,3} and PAVEL SOUCEK¹

¹Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42 Prague;

²Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruska 87, 100 00 Prague; ³First Faculty of Medicine, and

⁴Department of Oncology, General Teaching Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University in Prague,

Katerinska 32, 121 08 Prague; ⁵Department of Medicine, Hospital Atlas, Tomase Bati 5135, 760 01 Zlin;

⁶Institute of Epidemiology, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague, V Uvalu 84, 150 06

Prague; ⁷Department of Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine,

Academy of Sciences of Czech Republic, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

Received June 9, 2010; Accepted July 30, 2010

DOI: 10.3892/or_00000992

Abstract. Associations of functional single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 1B1, epoxide hydrolase 1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferase Pi-1 and deletions of glutathione S-transferases Mu-1 and θ -1 with colorectal cancer risk were investigated in a hospital-based case-control study on 495 matched pairs of Czech Caucasians. Polymorphisms were assessed by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism-based methods, allele-specific multiplex and allelic discrimination by real-time polymerase chain reaction. Carriers of variant Ser allele in codon 453 of cytochrome P450 1B1 (rs1800440) were at a significantly lower risk of colorectal cancer compared to carriers of the wild-type allele (adjusted odds ratio, aOR=0.68, CI=0.51-0.89, p=0.006). The combination of polymorphisms in codons 453 and 432 (rs1056836) of cytochrome P450 1B1 further increased the protective effect (aOR=0.53, CI=0.34-0.83, p=0.005). The glutathione S-transferase Mu-1 deletion was associated with a moderately elevated colorectal cancer risk (aOR=1.30, CI=1.01-1.68, p=0.044). Combination of glutathione S-transferase Mu-1 and θ -1 deletion was associated with a significantly higher colorectal cancer risk compared to the presence of both full-length genes (aOR=1.58, CI=1.01-2.47, p=0.044). Genetic polymorphisms in glutathione S-

transferase Pi-1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, epoxide hydrolase 1 and deduced epoxid hydrolase 1 activity did not modify the risk of colorectal cancer. These results provide further evidence that interaction between metabolic gene variants contributes to colorectal carcinogenesis.

Introduction

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer with an estimated 1,023,256 newly diagnosed cases and 529,020 deaths per year (1). In terms of CRC incidence, the Czech Republic ranks second in Europe (2) and the number of new cases is rapidly increasing (3). It is postulated that 20-30% of all patients with CRC have a family history of CRC that suggests a genetic contribution, common exposures among family members, or a combination of both (4). Red meat consumption has frequently shown an association with an increased risk of CRC. It has been proposed that this risk may be due to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heterocyclic amines produced when meat is cooked at high temperatures (5). These chemicals, aromatic amines and nitroso compounds may be found in tobacco smoke which is also recognized as a potential CRC risk factor (6). Metabolism of these chemicals is performed by the genetically variable xenobiotic-metabolizing enzymes (XME). Briefly, phase I XME such as cytochromes P450 (e.g. CYP1B1), epoxide hydroxylases (e.g. EPHX1) or oxidoreductases (e.g. NQO1) produce reactive metabolites which are then conjugated by transferases (e.g. GSTM1, GSTP1, GSTT1) to polar compounds in phase II reactions. Phase II metabolites may be further processed (metabolism, cleavage, hydrolysis, acetylation, etc.) by phase III XME (7). Genetic polymorphisms in XME genes that alter the expression and activity of the protein products are thus strong candidates for CRC risk modifiers.

Correspondence to: Dr Pavel Soucek, Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 100 42, Czech Republic
E-mail: psoucek@szu.cz

Key words: colorectal cancer, cytochrome P450, glutathione S-transferase, polymorphism, risk

Cytochromes P450 (CYPs) are the most important enzymes involved in the phase I of biotransformation. CYPs catalyze a large number of reactions modifying dietary and smoking-derived pre-carcinogens and participate in the metabolism of endogenous compounds including hormones and bile acids (8). CYP1B1 plays an important role in activating PAHs or heterocyclic amines to reactive metabolites that cause DNA damage. Polymorphisms in *CYP1B1* have recently been associated with CRC susceptibility (9). Epoxide hydrolase (*EPHX1*) catalyzes the hydrolysis of major metabolites of PAHs (epoxides) to less reactive *trans*-dihydrodiols. Two common alleles of *EPHX1* in codons 113 (site T337C, amino acid change Tyr113His, dbSNP: rs1051740) and 139 (A415G, His139Arg, rs2234922) affect enzyme activity (10). However, a lack of association of *EPHX1* polymorphisms with CRC risk has been reported (11,12). NAD(P)H:quinone oxidoreductase (*NQO1*) is an obligate two-electron reductase that can either bioactivate or detoxify quinones and may play an important role in chemoprevention (13). An *NQO1* polymorphism in codon 187 (C609T, Pro187Ser, rs1800566), resulting in an inactive enzyme, has been associated with the risk of CRC (12,14) and sporadic distal colorectal adenomas (15). Glutathione S-transferases (*GST*), *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* belong to the most frequently studied XMEs in molecular epidemiology of cancer. Large genomic deletions (*null* genotype) of *GSTM1* and *GSTT1* result in a complete lack of enzyme activities. A *GSTP1* polymorphism in codon 105 (A313G, Ile105Val, rs1695) generates an enzyme with different heat stability and substrate affinity (16). A study by Ferraz *et al* (17) suggested that *GSTT1* and *GSTP1* could play a role in the occurrence of *KRAS* and *TP53* mutations in CRC and a report by Moore *et al* (18) showed associations between colorectal adenomas and *GSTM1-plus* and *GSTT1-null* among smokers. Recently, we have reported an association of combined *EPHX1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms with genetic damage (higher DNA single-strand breaks) in general Czech population (19).

This study evaluated associations between polymorphisms in *CYP1B1*, *EPHX1*, *NQO1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* and risk of CRC in a relatively homogeneous population with one of the highest CRC incidences.

Materials and methods

Subjects. The study population comprised 495 patients with CRC (cases) and 495 individuals with no evidence of colorectal malignancy (controls). Eligibility criteria for study participation of cases and controls included Czech origin, ages 29 years or more, and consent to provide biological samples for genetic analysis. To reduce selection bias, only those subjects with no previous diagnosis were included in the study to avoid inclusion of patients with chronic diseases who may be repeatedly admitted to hospital and modify their habits because of their disease. Recruitment of participants was coordinated by Department of Oncology, General Teaching Hospital in Prague in the period between September 2004 and February 2006. Cases with histologically-confirmed positively-diagnosed CRC were recruited from patients visiting nine oncology departments (two in Prague, one in Benesov, Brno, Liberec, Ples, Pribram, Usti nad Labem and Zlin). The

participating hospitals are located throughout the Czech Republic; therefore, it is reasonable to expect, that the cases represent the general Czech population. During the study period, a total of 968 CRC cases provided consent to participate in the study. Of the recruited group, 16 cases met the Amsterdam criteria I and II for hereditary CRC and were excluded from the study (20). Four hundred and fifty-seven cases were excluded because eligibility criteria were not met or incomplete lifestyle and potential risk factor information was available or biological material was lacking.

Controls were recruited over the same period as the cases from individuals undergoing colonoscopy for various gastrointestinal complaints (macroscopic bleeding, positive fecal occult blood test, hemorrhoids, abdominal pain of unknown origin) from five large gastroenterological departments (Prague, Brno, Jihlava, Liberec, and Pribram). Due to the high incidence of CRC in the Czech Republic, colonoscopy is highly recommended and widely practiced. Controls were selected from those showing negative colonoscopy results for malignancy or idiopathic bowel diseases. Controls had no diagnosis of chronic disease necessitating repeated admittance to hospital (21). One hundred and ninety-three controls were excluded because eligibility criteria were not met or incomplete lifestyle and potential risk factor information was available or biological material was lacking. In the last step, controls were matched on the basis of age (± 2.5 years) to cases and thus 495 case-control pairs were established for this study. Study subjects provided by self-guided questionnaire information on their education, living area, lifestyle habits, body mass index (BMI), diabetes, family/personal history of cancer and long-term (at least 6 consecutive months) drug use. The case-control set was not collected specifically for the present study, but for previous studies on the risk of genetic polymorphisms in different pathways, as recently described (21).

All subjects were informed and gave written consent to participate in the study. The design of the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

Genotyping. Blood was collected during diagnostic procedures using tubes with K₃EDTA anticoagulant. DNA was isolated from lymphocytes using the phenol/chloroform extraction method as described earlier (22). Polymorphisms in *CYP1B1* (Leu432Val, dbSNP: rs1056836 and Asn453Ser, rs1800440), *GSTM1* (gene deletion) and *GSTT1* (gene deletion) were assayed by published methods: polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism and allele-specific multiplex PCR (23). Oligonucleotide primers were synthesized by Generi Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic). Polymorphisms in *GSTP1* (Ile105Val, rs1695), *NQO1* (Pro187Ser, rs1800566) and *EPHX1* (His113Tyr, rs1051740 and Arg139His, rs2234922) were assayed by allelic discrimination with *TaqMan* Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) using real time PCR in RotorGene 6000 (Corbett Research, Brisbane, Australia). The *TaqMan* assays (*GSTP1*, Ile105Val, C-3237198_20; *NQO1*, Pro187Ser, C-2091255_30; *EPHX1*, His113Tyr, C-14938_30 and Arg139His, C-11638783_30) were performed according to manufacturer's instructions

Table I. Characteristics of the studied population.

	Cases	Controls	cOR ^a	95% CI ^a	P-value
Gender					
Female	206 (41.6)	230 (46.5)	1.00 (reference)		
Male	289 (58.4)	265 (53.5)	1.22	0.95-1.57	0.125 ^a
Age at recruitment (years)					
Mean ± SD	57.2±11.5	55.5±13.8	1.01 ^b	1.00-1.02	0.036 ^c
Range	23-89	25-91			
BMI					
Mean ± SD	26.6±4.3	26.7±4.5	1.00	0.96-1.03	0.821 ^c
Range	13.1-44.9	16.6-44.3			
Smoking status					
Never smokers	243 (49.1)	195 (39.4)	1.00 (reference)		
Smokers	74 (14.9)	76 (15.4)	0.78	0.54-1.13	0.193 ^a
Ex-smokers >5 years	99 (20.0)	76 (15.4)	1.05	0.73-1.49	0.806 ^a
Ex-smokers ≤5 years	47 (9.5)	17 (3.4)	2.22	1.24-3.99	0.008 ^a
Missing	32 (6.5)	131 (26.4)	0.20	0.13-0.30	<0.001 ^a
Education					
Basic	112 (22.6)	89 (18.0)	1.00 (reference)		
High school	174 (35.2)	200 (40.4)	0.69	0.49-0.98	0.036 ^a
University	41 (8.3)	72 (14.5)	0.45	0.28-0.73	0.001 ^a
Missing	168 (33.9)	134 (27.1)	1.00	0.70-1.43	0.984 ^a
Living area					
Countryside	98 (19.8)	79 (16.0)	1.00 (reference)		
Suburban	50 (10.1)	78 (15.8)	0.52	0.33-0.82	0.005 ^a
Urban	207 (41.8)	212 (42.8)	0.79	0.55-1.12	0.184 ^a
Missing	140 (28.3)	126 (25.4)	0.90	0.61-1.31	0.572 ^a

Percentages in brackets. ^aPearson χ^2 test; cOR, crude odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval; ^bincrease of risk per one unit change in age at recruitment; ^cANOVA test.

(Applied Biosystems). EPHX1 enzyme activity was inferred according to the results of His113Tyr and Arg139His genotyping (22). For quality control, 10% of the samples were randomly selected and re-genotyped with 100% concordance of the results.

Statistical analysis. In the first round of analyses, Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the control group. The distribution of genotypes did not significantly deviate from equilibrium. The differences in distribution of the genotypes between cases and controls were assessed from 2x2 tables and Pearson's χ^2 test was used to test significance. We further employed binary logistic regression to model the association between the risk of CRC and the studied genotypes and their combinations while adjusting for the effects of the age at recruitment, sex, BMI, smoking, alcohol consumption, living area and education. The two-sided $p < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses were performed using Win SPSS v13.0 (SPSS, Chicago, IL). Our study had 85% power to detect odds ratio (OR) 1.5 at $\alpha = 0.05$ for the 0.15 rare allele frequency of *CYP1B1* codon 453 (the lowest frequency from the analyzed polymorphisms). The rest of the studied polymorphisms had higher power to detect this OR.

Results

Characteristics of study population. This case-control study is based on a comparison of 495 CRC cases and 495 controls. Basic characteristics and crude comparison of the cases and controls with respect to the potential confounders are given in Table I. The cases and controls differ significantly in their smoking status, education and living area. Despite the effort to match the controls and cases for age, the controls tend to be slightly younger than the cases (mean difference 1.7 years, $p = 0.036$). A biological significance of this age difference is unlikely; nevertheless, when evaluating the effects of studied genotypes and their combinations on the CRC risk, we accounted for age and for effects of the other potential risk factors by means of the binary logistic regression.

Associations of polymorphisms and selected gene combinations with colorectal cancer risk. The summary of crude and adjusted odds ratios (cOR and aOR), 95% confidence intervals (CI) and corresponding p-values is given in Tables II and III. Carriers of the variant Ser allele in codon 453 of *CYP1B1* were at significantly lower risk of CRC than the carriers of the wild-type (cOR=0.74, 95% CI=0.56-0.96,

Table II. Associations of polymorphisms in *CYP1B1*, *EPHX1*, *NQO1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* with colorectal cancer risk.

Gene	Genotype	Cases	Controls	cOR ^a	95% CI ^a	P-value ^a	aOR ^b	95% CI ^b	P-value ^b
<i>CYP1B1</i> codon 432	<i>Leu/Leu</i>	174 (35.2)	155 (31.3)	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	<i>Leu/Val</i>	237 (47.9)	262 (52.9)	0.81	0.6-1.07	0.129	0.84	0.63-1.11	0.222
	<i>Val/Val</i>	84 (17.0)	78 (15.8)	0.96	0.66-1.40	0.829	1.04	0.70-1.52	0.862
	<i>Leu/Val+Val/Val</i>	321	340	0.84	0.65-1.10	0.200	0.88	0.67-1.16	0.360
	<i>qVal</i> ^c	0.41	0.42						
<i>CYP1B1</i> codon 453	<i>Asn/Asn</i>	353 (71.3)	320 (64.6)	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	<i>Asn/Ser</i>	134 (27.1)	163 (32.9)	0.75	0.57-0.98	0.035	0.69	0.52-0.91	0.010
	<i>Ser/Ser</i>	8 (1.6)	12 (2.4)	0.60	0.24-1.50	0.277	0.52	0.21-1.29	0.157
	<i>Asn/Ser+Ser/Ser</i>	142	175	0.74	0.56-0.96	0.025	0.68	0.51-0.89	0.006
	<i>qSer</i> ^c	0.15	0.19						
<i>CYP1B1</i> diplotype	<i>Leu/Leu+Asn/Asn</i>	103	77	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	<i>Val+Ser</i> ^d	71	97	0.55	0.36-0.84	0.005	0.53	0.34-0.83	0.005
<i>NQO1</i> codon 187	<i>Pro/Pro</i>	346 (69.9)	344 (69.5)	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	<i>Pro/Ser</i>	134 (27.1)	138 (27.9)	0.97	0.73-1.28	0.806	1.00	0.75-1.33	0.997
	<i>Ser/Ser</i>	15 (3.0)	13 (2.6)	1.15	0.54-2.45	0.722	1.32	0.61-2.85	0.481
	<i>Pro/Ser+Ser/Ser</i>	149	151	0.98	0.75-1.29	0.890	1.03	0.78-1.35	0.853
	<i>qSer</i> ^c	0.17	0.17						
<i>GSTM1</i> (deletion)	<i>plus</i>	228 (46.1)	254 (51.3)	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	<i>null</i>	267 (53.9)	241 (48.7)	1.23	0.96-1.58	0.098	1.30	1.01-1.68	0.044
<i>GSTT1</i> (deletion)	<i>plus</i>	392 (79.2)	395 (79.8)	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	<i>null</i>	103 (20.8)	100 (20.2)	1.04	0.76-1.41	0.813	1.07	0.78-1.47	0.664
<i>GSTP1</i> codon 105	<i>Ile/Ile</i>	223 (45.1)	224 (45.3)	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	<i>Ile/Val</i>	229 (46.3)	226 (45.7)	1.02	0.78-1.32	0.895	1.01	0.77-1.32	0.944
	<i>Val/Val</i>	43 (8.7)	45 (9.1)	0.96	0.61-1.52	0.861	1.01	0.63-1.61	0.969
	<i>Ile/Val+Val/Val</i>	272	271	1.01	0.79-1.30	0.949	1.01	0.78-1.30	0.942
	<i>qVal</i> ^c	0.32	0.32						
<i>EPHX1</i> codon 113	<i>Tyr/Tyr</i>	221 (44.6)	231 (46.7)	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	<i>Tyr/His</i>	224 (45.3)	212 (42.8)	1.10	0.85-1.44	0.460	1.09	0.83-1.43	0.534
	<i>His/His</i>	50 (10.1)	52 (10.5)	1.01	0.65-1.55	0.982	0.96	0.62-1.49	0.869
	<i>Tyr/His+His/His</i>	274	264	1.09	0.85-1.39	0.523	1.06	0.82-1.37	0.635
	<i>qHis</i> ^c	0.33	0.32						
<i>EPHX1</i> codon 139	<i>His/His</i>	297 (60.0)	290 (58.6)	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
	<i>His/Arg</i>	173 (34.9)	183 (37.0)	0.92	0.71-1.20	0.551	0.89	0.68-1.17	0.411
	<i>Arg/Arg</i>	25 (5.1)	22 (4.4)	1.11	0.61-2.01	0.732	1.06	0.58-1.96	0.845
	<i>His/Arg+Arg/Arg</i>	198	205	0.94	0.73-1.22	0.651	0.91	0.70-1.18	0.482
	<i>qArg</i> ^c	0.23	0.23						

Number of genotype carriers presented (percentages in brackets). ^aCrude odds ratios (cOR) and 95% confidence intervals (95% CI); ^bodds ratios (aOR) and 95% confidence intervals (95% CI) adjusted for age at diagnosis, gender, smoking, education and living area; ^cfrequency of variant allele carriage in studied subgroups; ^dcarriers of at least one variant allele in codons 432 and 453.

Table III. Associations of combinations of polymorphisms in *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* with colorectal cancer risk.

Genotypes	Cases	Controls	cOR ^a	95% CI ^a	P-value ^a	aOR ^b	95% CI ^b	P-value ^b
<i>GSTM1</i> -plus+ <i>GSTT1</i> -plus	186	200	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
<i>GSTM1</i> -null+ <i>GSTT1</i> -null	61	46	1.43	0.93-2.20	0.107	1.58	1.01-2.47	0.044
<i>GSTM1</i> -plus+ <i>GSTP1</i> -Ile/Ile	148	116	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
<i>GSTM1</i> -null+ <i>GSTP1</i> -Val ^c	104	133	1.24	0.87-1.77	0.231	1.26	0.87-1.80	0.220
<i>GSTT1</i> -plus+ <i>GSTP1</i> -Ile/Ile	174	178	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
<i>GSTT1</i> -null+ <i>GSTP1</i> -Val ^c	54	54	1.02	0.67-1.57	0.918	1.09	0.70-1.71	0.694
<i>GSTM1</i> -plus+ <i>EPHX1</i> -medium/high	147	168	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
<i>GSTM1</i> -null+ <i>EPHX1</i> -low	96	84	1.31	0.91-1.89	0.154	1.36	0.93-1.97	0.111
<i>GSTT1</i> -plus+ <i>EPHX1</i> -medium/high	260	263	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
<i>GSTT1</i> -null+ <i>EPHX1</i> -low	38	45	1.20	1.75-1.91	0.446	1.27	0.79-2.05	0.330
<i>GSTP1</i> -Ile/Ile+ <i>EPHX1</i> -medium/high	142	146	1.00 (reference)			1.00 (reference)		
<i>GSTP1</i> -Valc+ <i>EPHX1</i> -low	96	92	1.07	0.74-1.55	0.708	1.07	0.73-1.56	0.727

Number of genotype carriers presented. ^aCrude odds ratios (cOR) and 95% confidence intervals (95% CI); ^bodds ratios (aOR) and 95% confidence intervals (95% CI) adjusted for age at diagnosis, gender, smoking, education and living area; ^ccarriers of at least one variant allele, i.e. genotypes Ile/Val or Val/Val in *GSTP1*.

$p=0.025$, Table II). The protective effect was more apparent, when the carriers of the wild-type genotype in both codons 432 and 453 of *CYP1B1* were combined and compared to carriers of the variant alleles in these codons (cOR=0.55, 95% CI=0.36-0.84, $p=0.005$, Table II). The adjusted analyses of the polymorphism in codon 453 of *CYP1B1* and the codon 432-453 diplotype also showed significant associations with CRC risk (aOR=0.68, 95% CI=0.51-0.89, $p=0.006$ and aOR=0.53, 95% CI=0.34-0.83, $p=0.005$, respectively, Table II). The deletion of *GSTM1* was associated with a moderate increase in the CRC risk (cOR=1.23, 95% CI=0.96-1.58, $p=0.098$, Table II). This association reached the level of statistical significance after adjustment (aOR=1.30, 95% CI=1.01-1.68, $p=0.044$, Table II). Neither genetic polymorphisms in *EPHX1*, *NQO1*, *GSTP1* and *GSTT1* nor the inferred *EPHX1* activity modified CRC risk (results not shown). In agreement with our previous studies (19,22), the effect of functionally-relevant combinations of polymorphisms in *GSTs* and *EPHX1* was also analyzed. Of the analyzed combinations (*GSTM1*-*GSTT1*, *GSTM1*-*GSTP1*, *GSTT1*-*GSTP1*, *GSTM1*-*EPHX1*-activity, *GSTT1*-*EPHX1*-activity, and *GSTP1*-*EPHX1*-activity), none were significantly associated with the CRC risk in crude analyses (Table III). However, adjusted analyses showed a significantly higher risk in individuals carrying the combination of *GSTM1*-null and *GSTT1*-null genotype when compared to *GSTM1*-plus and *GSTT1*-plus carriers (aOR=1.58, 95% CI=1.01-2.47, $p=0.044$, Table III). Smoking did not modify the observed effects of any studied polymorphisms (results not shown).

Discussion

The Czech Republic has one of the highest CRC incidences worldwide. Possible factors contributing to the high CRC

incidence in the Czech Republic may involve dietary habits, e.g. high content of fat containing diet based on fried and roasted pork meat (24), relatively homogeneous genetic background (25), and a good capture of CRC cases due to well established cancer registry.

The major purpose for defining genetic markers associated with cancer disease is to target preventive screening programs to high-risk individuals (FOBT, colonoscopy or flexible sigmoidoscopy in CRC) and interventions to prevent the development of cancer (dietary changes, cessation of smoking, avoidance of obesity). The study of association of XME polymorphisms with cancer needs to be controlled very carefully in terms of exposure, age and gender of participants (23,26). This was our primary focus during the statistical analyses. Most of the variables (age, gender, BMI and smoking) included in our statistical analyses as potential confounders are so-called obligatory confounders in the field of cancer epidemiology (27-29). Education was included as a surrogate measure for socio-economic status of study participants, which is also considered to be potentially important confounder. The living area (urban vs. rural) was selected as a surrogate measure of some features of lifestyle and environmental exposures. In the Czech Republic, both living area and education are commonly used for this purpose (30). We have used the colonoscopy-negative control group to ensure disease-free control individuals, as a negative colonoscopy result serves as the best available proof of the absence of CRC (31).

Variant allele frequencies of the studied XME polymorphisms in the control group did not significantly differ from previously published data from the Czech population (22,23). Polymorphisms in *EPHX1* (neither single polymorphisms nor their combinations which serve for enzyme activity deduction), *GSTP1* and *NQO1* did not modify CRC risk. The results

obtained in this study correspond to some previous studies [*EPHX1*, negative results (11,12,15)] but do not confirm findings published by others [*EPHX1* as a CRC protective factor; (32) and *NQO1* as a CRC risk factor (12,14,33)]. It is generally true that population-specific genetics and/or lifestyle differences together with variations in study design, study power and methodology may cause discrepancies among case-control studies. It is essential to reproduce results on adequate samples sizes from ethnically well-defined populations.

In our study, *GSTM1*-null genotype increased the CRC risk 1.3-fold alone and 1.6-fold in combination with the inheritance of *GSTT1*-null genotype. Similarly to our study, *GSTM1*-null and *GSTT1*-null genotypes were identified as CRC risk factors (OR=1.62, CI=1.06-2.46 and OR=1.64, OR=1.10-2.59, respectively) in the Turkish population (34). The combination of polymorphism in *GSTP1* with *GSTM1*-null was associated with higher CRC risk in a Japanese study (35). Elevation in CRC risk by inheritance of the *GSTM1*-null allele (OR=1.41) was also observed amongst UK CRC patients, although this effect did not reach statistical significance (36). However, no association of *GSTM1* or *GSTT1* with CRC risk was observed in the Scottish population (37). The combination of *GSTM1* and *GSTT1* deletions was associated with higher risk of developing a transverse or rectal tumor (34). Functional study on 208 German individuals, who underwent colonoscopy, observed significant decrease in GST activity, GSH levels and *GSTP1* expression from proximal to distant colon (38). Moreover, *GSTP1* seems highly relevant for CRC therapy as the *GSTP1* polymorphism in codon 105 was associated in a dose-dependent fashion with increased survival of patients with advanced CRC receiving 5-FU/oxaliplatin chemotherapy (39). Thus, in addition to the relevance for predictive testing, there may be a role of variants in XME genes as predictive therapeutic markers.

A study of Huang *et al.* (40) on African Americans and American Caucasians found that *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms may be slightly related to the CRC risk and that there may be ethnic differences in gene-smoking interactions. However, our study in the Czech population did not find any modifying effect of smoking. According to the study of Skjelbred *et al.* (41), *GSTM1*, *GSTP1* and *EPHX1* may modify the effect of dietary factors on the risk of developing CRC and colorectal adenoma. Moore *et al.* (18) published the association between advanced villous colorectal adenomas (precursors of CRC) and *GSTM1*-plus and *GSTT1*-null in smokers. A recent meta-analysis supports the role of *GSTM1*-null as a potential CRC risk factor, especially in Caucasian populations (42). Published results along with our data suggest that colorectal carcinogenesis may be partly driven by interaction between XME and environmental factors. The exact nature of these interactions needs to be studied in detail. Moreover, various populations and subpopulations might have a higher CRC risk and the underlying mechanisms may differ.

Carriers of the variant allele in codon 453 of *CYP1B1* (rs1800440) indicated a lower CRC risk. Analysis of the *CYP1B1* diplotype further underlined this effect. Our study adds additional information to recently reported observations. *CYP1B1* was found to be a CRC risk associated gene by

Bethke *et al.* (43). Fan *et al.* (44) suggested a significant interaction between *CYP1B1* and cigarette smoking in a CRC case-only study in the Chinese population. Furthermore, the association between CRC risk and polymorphisms in *CYP1B1* (and also *CYP1A1* and *CYP1A2*) was observed in the case-control study of Landi *et al.* (45). Although we identified the rs1800440 polymorphism in *CYP1B1* as a potential CRC risk-associated allele, the two previously published studies did not associate this SNP with CRC risk (43,45). Conflicting results of these case-control studies may be due to unknown interactions with environmental or other genetic factors and may vary according to the choice of polymorphisms to be genotyped. Bandiera *et al.* (46) demonstrated that P450 1B1-Ser453 protein displays lower intracellular protein levels and is degraded more rapidly than the other P450 1B1 variants. They concluded that it is probable that individuals with the *CYP1B1*-Ser453 allele have reduced metabolic activation of some endogenous (e.g. estrogens) and exogenous (e.g. PAHs or heterocyclic amines) carcinogens. Indeed, carriers of the variant *CYP1B1* Ser/Ser genotype in codon 453 showed a significantly reduced incidence of endometrial cancer compared with homozygotes who carried Asn at this position (OR=0.62; 95% CI=0.43-0.91) (47).

In conclusion, our study identified polymorphisms in *CYP1B1*, *GSTM1* and *GSTT1* as modifiers of CRC risk in the Czech population. If verified by independent studies, these polymorphisms might be used for identification of high-risk individuals. Preventive screening programs and interventions to prevent the development of CRC could then be targeted to these individuals.

Acknowledgements

The authors are grateful to Simona Susova, Ing from the National Institute of Public Health, Prague Czech Republic, for taking part in genotyping analyses. The study was supported by grants of the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health, no. IGA 10230-3, the Czech Science Foundation no. GACR 310/07/1430 and the Grant Agency of Charles University no. GAUK 15109/2009.

References

1. Kamangar F, Dores GM and Anderson WF: Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24: 2137-2150, 2006.
2. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M and Boyle P: Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18: 581-592, 2007.
3. Cancer Incidence 2005 in the Czech Republic. IHIS CR, NOR CR, Czech Republic, pp30-33, 2008.
4. Rustgi AK: The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* 21: 2525-2538, 2007.
5. Norat T, Bingham S, Ferrari P, *et al.*: Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst* 97: 906-916, 2005.
6. Liang PS, Chen TY and Giovannucci E: Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 124: 2406-2415, 2009.
7. Soucek P: Xenobiotics. In: *Encyclopedia of Cancer*. Schwab M (ed). 2nd edition. Springer-Verlag, New York, 2008.
8. Boursi B and Arber N: Current and future clinical strategies in colon cancer prevention and the emerging role of chemoprevention. *Curr Pharm Des* 13: 2274-2282, 2007.

9. Küry S, Buecher B, Robiou-du-Pont S, *et al*: Combinations of cytochrome P450 polymorphisms enhancing the risk for sporadic colorectal cancer related to red meat consumption. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 1460-1467, 2007.
10. Hassett C, Aicher L, Sidhu JS and Omiecinski CJ: Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 3: 421-428, 1994.
11. Robien K, Boynton A and Ulrich CM: Pharmacogenetics of folate-related drug targets in cancer treatment. *Pharmacogenomics* 6: 673-689, 2005.
12. Van der Logt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, *et al*: Role of epoxide hydrolase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, cytochrome P450 2E1 or alcohol dehydrogenase genotypes in susceptibility to colorectal cancer. *Mutat Res* 593: 39-49, 2006.
13. Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, Gibson NW, Franklin WA and Ross D: Characterization of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase DT-diaphorase. *Br J Cancer* 75: 69-75, 1997.
14. Begleiter A, Hewitt D, Maksymiuk AW, Ross DA and Bird RP: A NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 polymorphism is a risk factor for human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 2422-2426, 2006.
15. Mitrou PN, Watson MA, Loktionov AS, *et al*: Role of NQO1C609T and EPHX1 gene polymorphisms in the association of smoking and alcohol with sporadic distal colorectal adenomas: results from the UKFSS Study. *Carcinogenesis* 28: 875-882, 2007.
16. Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, *et al*: Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 224: 893-899, 1994.
17. Ferraz JM, Zinzindohoué F, Lecomte T, *et al*: Impact of GSTT1, GSTM1, GSTP1 and NAT2 genotypes on KRAS2 and TP53 gene mutations in colorectal cancer. *Int J Cancer* 110: 183-187, 2004.
18. Moore LE, Huang WY, Chatterjee N, *et al*: GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1823-1827, 2005.
19. Naccarati A, Soucek P, Stetina R, *et al*: Genetic polymorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: effects on DNA damage. *Mutat Res* 593: 22-31, 2006.
20. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP and Lynch HT: New clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116: 1453-1456, 1999.
21. Landi S, Gemignani F, Naccarati A, *et al*: Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis* 29: 579-584, 2008.
22. Sarmanova J, Susova S, Gut I, *et al*: Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet* 12: 848-854, 2004.
23. Vrana D, Pikhart H, Mohelnikova-Duchonova B, *et al*: The association between Glutathione S-transferase Gene polymorphisms and pancreatic cancer in central European Slavonic population. *Mutat Res* 680: 78-81, 2009.
24. Dofkova M, Kopriva V, Resova D, Rehurkova I and Ruprich J: The development of food consumption in the Czech Republic after 1989. *Public Health Nutr* 4: 999-1003, 2001.
25. Heath SC, Gut IG, Brennan P, *et al*: Investigation of the fine structure of European populations with applications to disease association studies. *Eur J Hum Genet* 16: 1413-1429, 2008.
26. Mohelnikova-Duchonova B, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z and Soucek P: CYP2A13, ADH1B and ADH1C gene polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas* 39: 144-148, 2010.
27. McFadden E, Luben R, Wareham N, Bingham S and Khaw KT: Occupational social class, educational level, smoking and body mass index, and cause-specific mortality in men and women: a prospective study in the European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition in Norfolk (EPIC-Norfolk) cohort. *Eur J Epidemiol* 23: 511-522, 2008.
28. Sengupta N, Gill KA, MacFie TS, Lai CS, Suraweera N, McDonald S and Silver A: Management of colorectal cancer: a role for genetics in prevention and treatment? *Pathol Res Pract* 204: 469-477, 2008.
29. Harriss DJ, Atkinson G, George K, *et al*: Lifestyle factors and colorectal cancer risk (1): systematic review and meta-analysis of associations with body mass index. *Colorectal Dis* 11: 547-563, 2009.
30. Zejglicová K, Kratenová J, Maly M and Kubínová R: Incidence of risk factors of chronic non-infectious diseases including socio-economic factors in the urban middle age population in the Czech Republic-results of HELEN study. *Cas Lek Cesk* 145: 936-942, 2006.
31. Singh H, Turner D, Xue L, Targownik LE and Bernstein CN: Risk of developing colorectal cancer following a negative colonoscopy examination: evidence for a 10-year interval between colonoscopies. *JAMA* 295: 2366-2373, 2006.
32. Sachse C, Smith G, Wilkie MJ, *et al*: A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 23: 1839-1849, 2002.
33. Chao C, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P and Hashibe M: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1 Pro187Ser polymorphism and the risk of lung, bladder, and colorectal cancers: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 979-987, 2006.
34. Ates NA, Tamer L, Ates C, Ercan B, Elipek T, Ocal K and Camdeviren H: Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet* 43: 149-163, 2005.
35. Yoshioka M, Katoh T, Nakano M, Takasawa S, Nagata N and Itoh H: Glutathione S-transferase (GST) M1, T1, P1, N-acetyltransferase (NAT) 1 and 2 genetic polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer. *J UOEH* 21: 133-147, 1999.
36. Ye Z and Parry JM: Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to colon cancer. *Teratog Carcinog Mutagen* 22: 385-392, 2002.
37. Little J, Sharp L, Masson LF, Brockton NT, Cotton SC, Hailes NE and Cassidy J: Colorectal cancer and genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1: a case-control study in the Grampian region of Scotland. *Int J Cancer* 119: 2155-2164, 2006.
38. Hoensch H, Peters WH, Roelofs HM and Kirch W: Expression of the glutathione enzyme system of human colon mucosa by localisation, gender and age. *Curr Med Res Opin* 22: 1075-1083, 2006.
39. Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC and Lenz HJ: Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 936-942, 2002.
40. Huang K, Sandler RS, Millikan RC, Schroeder JC, North KE and Hu J: GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, cigarette smoking, and risk of colon cancer: a population-based case-control study in North Carolina (United States). *Cancer Causes Control* 17: 385-394, 2006.
41. Skjelbred CF, Saebø M, Hjärtåker A, *et al*: Meat, vegetables and genetic polymorphisms and the risk of colorectal carcinomas and adenomas. *BMC Cancer* 7: 228, 2007.
42. Gao Y, Cao Y, Tan A, Liao C, Mo Z and Gao F: Glutathione S-transferase M1 polymorphism and sporadic colorectal cancer risk: an updating meta-analysis and HuGE review of 36 case-control studies. *Ann Epidemiol* 20: 108-121, 2010.
43. Bethke L, Webb E, Sellick G, *et al*: Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 7: 123, 2007.
44. Fan C, Jin M, Chen K, Zhang Y, Zhang S and Liu B: Case-only study of interactions between metabolic enzymes and smoking in colorectal cancer. *BMC Cancer* 7: 115, 2007.
45. Landi S, Gemignani F, Moreno V, *et al*: A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of colorectal cancer. *Pharmacogenet Genomics* 15: 535-546, 2005.
46. Bandiera S, Weidlich S, Harth V, Broede P, Ko Y and Friedberg T: Proteasomal degradation of human CYP1B1: effect of the Asn453Ser polymorphism on the post-translational regulation of CYP1B1 expression. *Mol Pharmacol* 67: 435-443, 2005.
47. McGrath M, Hankinson SE, Arbeitman L, Colditz GA, Hunter DJ and De Vivo I: Cytochrome P450 1B1 and catechol-O-methyltransferase polymorphisms and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 25: 559-565, 2004.

Příloha č. 6

Soucek P, Susova S, **Mohelnikova-Duchonova B**, Gromadzinska J, Moraviec-Sztandera A, Vodicka P, Vodickova L.

Polymorphisms in metabolizing enzymes and the risk of head and neck squamous cell carcinoma in the Slavic population of the central Europe.

Neoplasma. 2010;57(5):415-21. (IF₂₀₁₂ = 1,5)

Polymorphisms in metabolizing enzymes and the risk of head and neck squamous cell carcinoma in the Slavic population of the central Europe

P. SOUCEK¹, S. SUSOVA¹, B. MOHELNIKOVA-DUCHONOVA^{1,2}, J. GROMADZINSKA³, A. MORAVIEC-SZTANDERA⁴, P. VODICKA⁵, L. VODICKOVA^{1,5}

¹Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; e-mail: psoucek@szu.cz, ²First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic; ³Department of Toxicology and Carcinogenesis, Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Poland; ⁴Department of Head and Neck Cancer, Medical University of Lodz, Lodz, Poland; ⁵Department of Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of Czech Republic, Prague, Czech Republic

Received October 10, 2009

The question of susceptibility to squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN) in the environmental context was addressed by analysis of functional polymorphisms in enzymes metabolizing smoke constituents and/or alcohol (CYP2A13, CYP1B1, EPHX1, NQO1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, ADH1B and ADH1C). Case-control study of 122 age- and sex-matched pairs of subjects was performed using so far unexplored Central European Slavic population with high level of tobacco and alcohol abuse.

Age-, gender-, smoking- and alcohol-adjusted logistic regression failed to demonstrate any significant association of the analyzed polymorphisms with the SCCHN risk. When interactions between potential modifiers of effect, i.e. smoking and alcohol were tested, drinkers seemed to be at lower risk than nondrinkers when carrying the heterozygous genotype Ile/Val in codon 432 of *CYP1B1* (OR=0.42; 95% CI=0.21-0.83; p=0.013 vs. OR=1.02; 95% CI=0.34-2.94; p=0.977). Similarly, drinkers were at lower risk than nondrinkers when carrying the heterozygous genotype Pro/Ser in codon 187 of *NQO1* (OR=0.41; 95% CI=0.19-0.88; p=0.022 vs. OR=0.96; 95% CI=0.29-3.12; p=0.948). More interestingly, drinkers carrying the rare homozygous genotype Val/Val in codon 350 of *ADH1C* were at significantly higher risk than nondrinkers carrying this genotype (OR=4.01; 95% CI=1.61-10.01; p=0.003 vs. OR=0.93; 95% CI=0.25-3.57; p=0.919). This result confirmed findings of previously published studies. Smoking did not significantly modify the effect of genotypes.

Our data thus demonstrate that genetic susceptibility to SCCHN shall be further followed on populations with different genetic background and lifestyle.

Keywords: oral cancer; exposure; metabolism; polymorphism; risk

Squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN, OMIM no.: 275355) represents a serious health problem. In 2002, SCCHN was ranked as the eighth leading cause of cancer death worldwide. Approximately 481,100 new cases developed, and 320,000 persons died of this disease [1]. Although the SCCHN etiology remains unknown, the majority of cases can be attributed to tobacco and alcohol use [2]. Certain subsets of SCCHN have been related to Human Papillomavirus [3].

It has been estimated that main-stream tobacco smoke contains over 60 pro-carcinogens or carcinogens [4]. Additionally, a number of studies have suggested that ethanol along with elements of cigarette smoke may act as co-carcinogen and enhance tumor formation [5, 6]. Regarding the ethanol itself,

its main metabolite acetaldehyde is a known mutagen and carcinogen, but discrimination between the role of ethanol and tobacco smoke is usually difficult due to synergic effects [7].

Sporadic carcinogenesis is a complex, multistage process, putatively modulated by genetic polymorphisms (SNPs) in a number of genes. SNPs in the coding and regulatory sequences of genes encoding xenobiotic-metabolizing (XME), DNA repair and cell cycle enzymes may result in subtle structural alterations with an effect on the protein function [8]. Thus, sporadic cancer may develop in individuals with combinations of relatively common allelic variants with low penetrance and moderately altered functions, but with significantly increased susceptibility to disease in connection with various environmental exposures and lifestyle factors [9, 10].

In order to address the question of susceptibility to SCCHN in the environmental context, we have analyzed functional polymorphisms in XME metabolizing smoke constituents and/or alcohol (CYP2A13, CYP1B1, EPHX1, NQO1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, ADH1B and ADH1C). Case-control study was performed using Central European Slavic population with high level of tobacco and alcohol abuse. Our study thus reflected conclusion of the recent review: "Cohort studies that simultaneously consider multiple genetic and environmental factors possibly involved in carcinogenesis of the head and neck are needed to ascertain not only the relative contribution of these factors to tumor development but also the contributions of their putative interactions" [11].

Patients and methods

Subjects. Studied cases included 122 Czech and Polish patients of Slavic Caucasian origin with histologically diagnosed squamous cell carcinoma of the upper-aerodigestive tract (i.e. pharynx, hypopharynx and larynx) and the oral cavity (SCCHN). Both the Czech (n=39) and Polish (n=83) cases were sampled in the period between September 2004 and February 2007 by Otorhinolaryngology and Oncology departments in Prague and Lodz. Clinical-pathological data on patients were collected from their medical records (date of diagnosis, localization of tumor, TNM stage according to UICC and histological type of cancer). Information concerning sex, age and tobacco and alcohol abuse was obtained from interviews or clinical records at the time of diagnosis. Randomly selected controls were 179 cancer-free subjects recruited during the 3 month period after the cases recruitment by general practitioners in Prague. Controls were included into the study under the condition that the difference in their age was not larger than 5 years from cases recruited in the same period. Basic epidemiological data on all participants were collected from face-to-face questionnaire survey (personal and family history, short occupational history, smoking and drinking history, history of physical activity, reproductive history and nutritional information). At the end of the recruitment period controls were age- and sex-matched to the cases and thus 122 controls were included into the genotyping stage. Blood samples of 122 cases and 122 controls were available in sufficient quality for genotyping. All participants were informed and gave their written consent to participate in the study. The design of the study was approved by the Ethical Committees of the 1st and 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic and Bioethical Committee of the Nofer Institute of Occupational Medicine in Lodz, Poland.

DNA isolation and genotyping. Blood was collected during diagnostic procedures using tubes with K₂EDTA anticoagulant. Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes using a BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Valencia, CA) by KingFisher mL automated system (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) according to the procedure supplied by the manufacturer. Polymorphisms in CYP1B1 (Leu432Val,

dbSNP: rs1056836 and Asn453Ser, rs1800440), GSTM1 (gene deletion) and GSTT1 (gene deletion) were assayed by published polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism-based methods and allele-specific multiplex PCR [12]. Oligonucleotide primers were synthesized by Geneti Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic). Polymorphisms in GSTP1 (Ile105Val, rs1695), NQO1 (Pro187Ser, rs1800566), EPHX1 (His113Tyr, rs1051740 and Arg139His, rs2234922), CYP2A13 (Arg101STOP, rs72552266), ADH1B (Arg48His, rs1229984), and ADH1C (Ile350Val, rs698) were assayed by allelic discrimination with TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) using real time PCR in RotorGene 6000 (Corbett Research, Brisbane, Australia). The TaqMan assays (GSTP1, Ile105Val, C__3237198_20; NQO1, Pro187Ser, C__2091255_30; EPHX1, His113Tyr, C__14938_30, Arg139His, C__11638783_30; CYP2A13, Arg101STOP, C__30634006_10; ADH1B, Arg48His, C__2688467_20 and ADH1C, Ile350Val, C__26457410_10,) were used according to instructions of manufacturer (Applied Biosystems). EPHX1 enzyme activity was deduced according to the results of His113Tyr and Arg139His genotyping [13]. The non-template control consisted of a reaction tube in which water was used in place of DNA sample. 10% of randomly selected samples were reanalyzed with 100% concordance of the results.

Statistical analysis. In the first round of analyses, Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the case and control group. Then the Pearson's χ^2 was used to test differences in genotype and allele distribution between case and controls and unadjusted risk was estimated. Binary logistic regression was performed to estimate odds ratios (OR), 95% confidence interval for OR and corresponding p-values of different genotype frequencies among the case and control group, adjusting for the age at recruitment, sex, smoking and alcohol consumption. Furthermore, we tested for modifying effect of smoking and alcohol, on the associations of interest. The p<0.05 would be considered significant. Analyses were performed using Win SPSS v15.0 (SPSS, Chicago, IL).

Results

Characteristics of the studied population. Complete characteristics of the studied population are presented in Table 1. The gender distribution, age at diagnosis and alcohol consumption did not significantly differ between both groups. Analyses confirmed smoking as SCCHN risk predictor (OR = 15.49; p<0.001; Table 1).

Polymorphisms and SCCHN risk. Unadjusted analyses showed that carriers of the heterozygous genotype in codon 432 of CYP1B1 (Ile/Val) were at significantly decreased risk of SCCHN in comparison with the common homozygous genotype (Ile/Ile) carriers (OR=0.54; 95% CI=0.31–0.96; p=0.035). However, inheritance of the rare homozygous Val/Val genotype did not significantly affect the risk (OR=1.27; 95% CI=0.57–2.78; p=0.565) and the risk was not modified by

TABLE 1: Characteristics of the studied population

Percentages in brackets

	Controls	Cases	OR	95% CI	p
Gender					
Females	28 (23.0)	26 (21.5)	1.00 (reference)		
Males	94 (77.0)	96 (78.5)	1.09	0.59 – 1.99	0.784 [†]
Age at recruitment (years)					
Mean ± SD	60.5 ± 10.0	60.6 ± 10.1	-	-	0.916 [†]
Range	31 - 84	31 - 86			
Smoking status					
Nonsmokers	77 (65.3)	12 (10.8)	1.00 (reference)		
Smokers	41 (34.7)	99 (89.2)	15.49	7.62 – 31.48	<0.001 [†]
Unknown	4	11			
Drinking status					
Nondrinkers	33 (28.0)	34 (28.8)	1.00 (reference)		
Drinkers	85 (72.0)	84 (71.2)	0.96	0.54 – 1.69	0.885 [†]
Unknown	4	4			

[†] Pearson Chi-Square Test; OR, crude odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval, p-two sided[‡] ANOVA test

the second followed polymorphism in codon 453 of *CYP1B1* (results not shown). Rare homozygotes for polymorphism in codon 350 of *ADH1C* (Val/Val) were at significantly higher SCCHN risk than carriers of the common homozygous genotype Ile/Ile (OR=2.70; 95% CI=1.28–5.56; p=0.009). Neither polymorphisms in *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *NQO1*, *CYP2A13*, *ADH1B* nor the deduced *EPHX1* activity showed significant association with the SCCHN risk in the unadjusted analyses (results not shown). Age-, gender-, smoking- and alcohol-adjusted logistic regression failed to demonstrate any significant association of the analyzed polymorphisms with the SCCHN risk (Table 2). The effect of heterozygous genotype in codon 432 of *CYP1B1* was at the border of significance (p=0.055, Table 2) and the effect of rare homozygous genotype of *ADH1C* was not significant (p=0.237). Combination of *EPHX1*-low activity with *GSTM1*-null genotype did not significantly affect the SCCHN risk (OR=0.73; 95% CI=0.34-1.59; p=0.426). When interactions between potential modifiers of effect, i.e. the followed exposure factors (smoking and alcohol) and the studied genotypes were tested, drinkers seemed to be at lower risk than nondrinkers when carrying the heterozygous genotype Ile/Val in codon 432 of *CYP1B1* (OR=0.42; 95% CI=0.21-0.83; p=0.013 vs. OR=1.02; 95% CI=0.34-2.94; p=0.977). Similarly, drinkers were at lower risk than nondrinkers when carrying the heterozygous genotype Pro/Ser in codon 187 of *NQO1* (OR=0.41; 95% CI=0.19-0.88; p=0.022 vs. OR=0.96; 95% CI=0.29-3.12; p=0.948). More interestingly, drinkers carrying the rare homozygous genotype Val/Val in codon 350 of *ADH1C* were at significantly higher risk than nondrinkers carrying this genotype (OR=4.01; 95% CI=1.61-10.01; p=0.003 vs. OR=0.93; 95% CI=0.25-3.57; p=0.919). Other interactions with alcohol were not significant (results not

shown). Smoking did not significantly modify the effect of genotypes as well (results not shown).

Discussion

It is assumed that genetic variation in carcinogen metabolism modifies the risk of exposure-related cancer [14]. Tobacco carcinogens such as 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) are metabolized in the human body by cytochromes P450 (P450, EC 1.14.14.1). NNK induces lung tumors in all laboratory animals tested as well as the nasal cavity, pancreatic cancer, and liver tumors in rats [15]. P450 2A13 (OMIM: 608055) was suggested the most active enzyme in metabolic activation of NNK [16]. The nonsense polymorphism, *CYP2A13**1/*7 (Arg101Stop, rs72552266,) may be important modifier of tobacco-associated cancer risk because the truncated protein lacks enzymatic activity [17]. The role of *CYP2A13* knock-out polymorphisms in SCCHN was so far not studied and our recent study suggested a possible role of this polymorphism in pancreatic cancer etiology [18]. However, due to the low numbers of studied SCCHN cases the power of our present study was not high enough to answer this question and larger multi-centric study should be used in order to clarify the role of rs72552266 in SCCHN.

Cytochrome P450 1B1 (OMIM: 601771) plays an important role in activating polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) or heterocyclic amines to reactive metabolites that cause DNA damage. Certain *CYP1B1* haplotypes have recently been associated with SCCHN [19]. Our results suggested possible association of the heterozygous genotype Ile/Val in codon 432 of *CYP1B1* with the increased SCCHN risk in unadjusted analyses (p=0.035). However, this observation was not confirmed by age-, gender-, smoking- and alcohol-

TABLE 2: Associations of polymorphisms in CYP1B1, EPHX1, NQO1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, CYP2A13, ADH1B and ADH1C with SCCHN risk
Numbers of genotype carriers presented (percentages in brackets).

Gene	Genotype	Controls	Cases	OR [†]	95% CI [†]	p [†]
CYP1B1 codon 432	<i>Leu/Leu</i>	37 (30.3)	46 (39.7)	1.00 (reference)		
	<i>Leu/Val</i>	71 (58.2)	48 (41.4)	0.49	0.24 – 1.01	0.055
	<i>Val/Val</i>	14 (11.5)	22 (19.0)	1.02	0.36 – 2.94	0.982
	<i>Leu/Val+Val/Val</i>	85	70	0.58	0.29 – 1.14	0.115
CYP1B1 codon 453	<i>Asn/Asn</i>	83 (68.0)	79 (68.1)	1.00 (reference)		
	<i>Asn/Ser</i>	34 (27.9)	31 (26.7)	1.56	0.72 – 3.45	0.252
	<i>Ser/Ser</i>	5 (4.1)	6 (5.2)	1.37	0.30 – 6.25	0.684
	<i>Asn/Ser+Ser/Ser</i>	39	37	1.51	0.74 – 3.12	0.257
NQO1 codon 187	<i>Pro/Pro</i>	83 (68.6)	92 (79.3)	1.00 (reference)		
	<i>Pro/Ser</i>	35 (28.9)	21 (18.1)	0.53	0.25 – 1.14	0.105
	<i>Ser/Ser</i>	3 (2.5)	3 (2.6)	1.10	0.12 – 10.0	0.935
	<i>Pro/Ser+Ser/Ser</i>	38	24	0.57	0.28 – 1.19	0.134
GSTM1 (deletion)	<i>plus</i>	52 (42.6)	52 (44.8)	1.00 (reference)		
	<i>null</i>	70 (57.4)	64 (55.2)	0.99	0.71 – 1.37	0.946
GSTT1 (deletion)	<i>plus</i>	93 (85.3)	92 (79.3)	1.00 (reference)		
	<i>null</i>	16 (14.7)	24 (20.7)	1.02	0.68 – 1.56	0.908
GSTP1 codon 105	<i>Ile/Ile</i>	57 (46.7)	56 (48.3)	1.00 (reference)		
	<i>Ile/Val</i>	55 (45.1)	53 (45.7)	1.22	0.63 – 2.38	0.564
	<i>Val/Val</i>	10 (8.2)	7 (6.0)	1.06	0.33 – 3.45	0.920
	<i>Ile/Val+Val/Val</i>	65	60	1.20	0.64 – 2.27	0.557
EPHX1 codon 113	<i>Tyr/Tyr</i>	53 (46.9)	60 (51.7)	1.00 (reference)		
	<i>Tyr/His</i>	48 (42.5)	42 (36.2)	0.71	0.34 – 1.45	0.348
	<i>His/His</i>	12 (10.6)	14 (12.1)	1.69	0.56 – 5.01	0.354
	<i>Tyr/His+His/His</i>	60	56	0.83	0.43 – 1.61	0.591
EPHX1 codon 139	<i>His/His</i>	77 (63.1)	71 (61.2)	1.00 (reference)		
	<i>His/Arg</i>	41 (33.6)	40 (34.5)	0.96	0.49 – 1.89	0.910
	<i>Arg/Arg</i>	4 (3.3)	5 (4.3)	0.94	0.20 – 4.55	0.940
	<i>His/Arg+Arg/Arg</i>	45	45	0.94	0.49 – 1.82	0.861
EPHX1 activity	low	44 (38.9)	38 (32.8)	1.05	0.53 – 2.08	0.870
	medium	49 (43.4)	55 (47.4)	1.00 (reference)		
	high	20 (17.7)	23 (19.8)	0.89	0.39 – 2.04	0.796
CYP2A13 codon 101	<i>Asn/Asn</i>	119 (68.0)	120 (99.2)	1.00 (reference)		
	<i>Asn/STOP</i>	2 (1.7)	1 (0.8)	1.12	0.07 – 16.67	0.932
	<i>STOP/STOP</i>	0 (0)	0 (0)	– [‡]	– [‡]	– [‡]
ADH1B codon 48	<i>Arg/Arg</i>	111 (91.0)	101 (90.2)	1.00 (reference)		
	<i>Arg/His</i>	10 (8.2)	21 (9.0)	2.38	0.61 – 9.10	0.214
	<i>His/His</i>	1 (0.8)	0 (0)	– [‡]	– [‡]	– [‡]
	<i>Asn/Ser+Ser/Ser</i>	11	21	1.67	0.45 – 6.25	0.443
ADH1C codon 350	<i>Ile/Ile</i>	39 (32.2)	30 (24.8)	1.00 (reference)		
	<i>Ile/Val</i>	64 (52.9)	54 (44.6)	0.98	0.46 – 2.13	0.971
	<i>Val/Val</i>	18 (14.9)	37 (30.6)	1.75	0.69 – 4.55	0.237
	<i>Ile/Val+Val/Val</i>	82	91	1.12	0.54 – 2.33	0.756

[†] Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) adjusted for age at diagnosis, gender, smoking and alcohol

[‡] Statistics could not be performed due to the absence of individuals in one or more of analyzed groups

adjusted analyses (p=0.055) and the contribution of the rare homozygous genotype to the risk was also non-significant. On the contrary, the observed modification of SCCHN risk by interaction between alcohol and this polymorphism (p=0.013) warrants further study.

NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1, EC 1.6.99.2, OMIM: 125860) is an obligate two-electron reductase that can either bioactivate or detoxify quinones and has been proposed to play an important role in chemoprevention [20]. NQO1 polymorphism in codon 187 (Pro187Ser, rs1800566), encoding

an inactive enzyme was shown to influence the risk of breast cancer in Czech [21] and Austrian [22] populations. Moreover, recent study showed that *NQO1* Pro187Ser polymorphism may play role of a strong prognostic and predictive factor in breast cancer [23]. Begleiter et al [24] did not find significant association of two *NQO1* polymorphisms (Pro187Ser and Trp465Arg) with SCCHN. Similarly, Harth et al. [25] also did not find association of Pro187Ser polymorphism in *NQO1* with SCCHN. We observed, that drinkers had significantly lower SCCHN risk when carrying the *NQO1* heterozygous genotype ($p=0.022$) in comparison with drinkers carrying the common genotype (Pro/Pro) but in nondrinkers no effect on the risk was evident ($p=0.948$). However, not much was published about interaction between *NQO1* and alcohol. The association between alcohol and colorectal adenoma was modified by *NQO1* Pro187Ser genotype in UKFSS Study. Higher risk was found among individuals with the common Pro/Pro genotype (OR=1.49; 95% CI=1.11-2.02; P-interaction=0.024; [ref. 26]). Therefore, larger studies should confirm or rule out our observation of interaction between *NQO1* knock-out polymorphism and alcohol consumption towards SCCHN risk.

Epoxide hydrolase (*EPHX1*, EC 3.3.2.3, OMIM: 132810) catalyzes the hydrolysis of epoxides (originating from e.g. P450 1B1-mediated metabolism of PAHs) to less reactive *trans*-dihydrodiols. Two common alleles of *EPHX1* that can be detected in codons 113 (Tyr113His, rs1051740) and 139 (His139Arg, rs2234922) change the enzyme activity [27]. Glutathione S-transferases (*GST*, EC 2.5.1.18) *GSTM1* (OMIM: 138350), *GSTP1* (OMIM: 134660) and *GSTT1* (OMIM: 600436) belong to the most frequently studied XME in molecular epidemiology of cancer. Large genomic deletions (null genotype) of *GSTM1* and *GSTT1* produce complete lack of enzyme activities. *GSTP1* polymorphism in codon 105 (Ile105Val, rs1695) generates enzyme with different heat stability and substrate affinity [28]. We have found that combination of *EPHX1*-low deduced activity with either *GSTM1*-null or *GSTT1*-null genotypes significantly increased levels of DNA single strand breaks as an early genotoxicity marker in peripheral blood lymphocytes of 158 healthy volunteers [9]. SCCHN is cancer highly dependent at environmental factors (alcohol and smoking) and thus it seemed to be a suitable candidate for evaluation of the previously found genotoxicity relevance of metabolic polymorphisms. However, we did not find association of either single *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* polymorphisms, the deduced *EPHX1* activity nor the combination of *EPHX1* activity and *GSTM1* polymorphism with SCCHN risk. Thus, our results confirmed the lack of association of functional *EPHX1* polymorphisms and the deduced enzyme activity with SCCHN risk published previously [29, 30]. Our results also support the conclusion of recent meta-analysis that *GSTM1* null genotype significantly increases susceptibility to oral cancer in Asians but not Caucasians [31] and comply with negative results on *GSTP1* and *GSTT1* polymorphisms [32].

Ethanol metabolism is mediated by both the oxidative and the non-oxidative pathways [33]. The oxidative pathway is particularly catalyzed by alcohol dehydrogenases (*ADH*, EC 1.1.1.1), aldehyde dehydrogenases (*ALDH*, EC 1.2.1.5) and less by P450 2E1 [34]. Previous case-control studies showed the association between *ADH1B*1* (Arg) allele and an increased risk of SCCHN [35, 36]. Carriage of *ADH1C*2/*2* (Val/Val) genotype increased risk of SCCHN in heavy (OR=2.65; 95% CI=1.08-2.14) and moderate (OR=1.6; 95% CI=1.15-2.03) drinkers [37]. Similar results were published by Hashibe et al. [38] in a large study on Central European population (Czech, Polish, Romanian, Russian and Slovak) but this study followed more heterogeneous patient group including SCC esophageal cancers. Our study thus did not confirm the published associations of SCCHN with the *ADH1B* (OMIM: 103720) common homozygous genotype. However, in our study the *ADH1C* (OMIM: 103730) rare homozygous genotype (Val/Val) was associated with SCCHN risk in all participants (unadjusted OR=2.70, $p=0.009$) and especially in drinkers (OR=4.01, $p=0.003$). On the other hand, the common Ile/Ile genotype of *ADH1C* was identified as an independent risk factor for the development of alcohol-associated tumors among heavy drinkers, indicating a genetic predisposition of individuals carrying this genotype [39]. Another study on Caucasians, however reported an inversed association in heavy drinkers carrying the rare *ADH1C* Val/Val genotype (OR=7.1; 95% CI=2.3-22.0) suggesting its association with susceptibility to smoking and drinking-related SCCHN by modifying the biologically effective dose of alcohol [40]. It remains to be discovered e.g. by meta-analyses, whether these discrepancies were caused by different populations under study (Asians vs. Caucasians) or variation in study design. Reports on null or confirmatory results may play an important role in this effort.

In conclusion, our data demonstrate complex nature of interactions between genetic susceptibility, environmental factors and SCCHN risk. More studies in various populations with different genetic background and lifestyle habits are needed to understand the variations in SCCHN risks reported so far and to move towards reliable biomarker of susceptibility for targeting of preventive measures.

Acknowledgements: The study was supported by grant of the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health no.: IGA 9423-3.

References

- [1] PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108. [doi:10.3322/canjclin.55.2.74](https://doi.org/10.3322/canjclin.55.2.74)
- [2] SCHANTZ SP, HUANG Q, SHAH K, MURTY VV, HSU TC et al. Mutagen sensitivity and environmental exposures as contributing causes of chromosome 3p losses in head and neck cancers. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1239-1246. [doi:10.1093/carcin/21.6.1239](https://doi.org/10.1093/carcin/21.6.1239)

- [3] RAGIN CC, MODUGNO F, GOLLIN SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 2007; 86: 104–14. [doi:10.1177/154405910708600202](https://doi.org/10.1177/154405910708600202)
- [4] International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoke and involuntary smoking. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2004, vol 83. IARC, Lyon, France, pp. 53–119.
- [5] MALATS N, PORTA M, COROMINAS JM, PIÑOL JL, RIFÀ J, et al. Ki-ras mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. PANK-ras I Project Investigators. *Int J Cancer* 1997; 70: 661–7. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970317\)70:6<661::AID-IJC6>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970317)70:6<661::AID-IJC6>3.0.CO;2-T)
- [6] ZHANG L, WEDDLE DL, THOMAS PE, ZHENG B, CASTONGUAY A, et al. Low levels of expression of cytochromes P-450 in normal and cancerous fetal pancreatic tissues of hamsters treated with NNK and/or ethanol. *Toxicol Sci* 2000; 56: 313–23. [doi:10.1093/toxsci/56.2.313](https://doi.org/10.1093/toxsci/56.2.313)
- [7] LEWIN F, NORELL SE, JOHANSSON H, GUSTAVSSON P, WENNERBERG J et al. Smoking tobacco, oral snuV, and alcohol in the aetiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1998; 82: 1367–1375. [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19980401\)82:7<1367::AID-CNCR21>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19980401)82:7<1367::AID-CNCR21>3.0.CO;2-3)
- [8] PERERA FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 1997; 278: 1068–73. [doi:10.1126/science.278.5340.1068](https://doi.org/10.1126/science.278.5340.1068)
- [9] NACCARATI A, SOUCEK P, STETINA R, HAUFROID V, KUMAR R, et al. Genetic polymorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: effects on DNA damage. *Mutat Res* 2006; 593: 22–31. [doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.06.016](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.016)
- [10] BERMEJO JL, HEMMINKI K. Gene-environment studies: any advantage over environmental studies? *Carcinogenesis* 2007; 28: 1526–32. [doi:10.1093/carcin/bgm068](https://doi.org/10.1093/carcin/bgm068)
- [11] HIYAMA T, YOSHIHARA M, TANAKA S, CHAYAMA K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk. *Int J Oncol* 2008; 32: 945–73.
- [12] NEDELICHEVA-KRISTENSEN V, ANDERSEN TI, ERIKSTEIN B, GEITVIK G, SKOVLUND E et al. Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 441–447. [doi:10.1097/00008571-199810000-00009](https://doi.org/10.1097/00008571-199810000-00009)
- [13] SARMANOVA J, TYNKOVA L, SUSOVA S, GUT I, SOUCEK P. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes: allele frequencies in the population of the Czech Republic. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 781–788. [doi:10.1097/00008571-200012000-00003](https://doi.org/10.1097/00008571-200012000-00003)
- [14] SUZUKI H, MORRIS JS, LI Y, DOLL MA, HEIN DW, et al. Interaction of the cytochrome P4501A2, SULT1A1 and NAT gene polymorphisms with smoking and dietary mutagen intake in modification of the risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1184–91. [doi:10.1093/carcin/bgn085](https://doi.org/10.1093/carcin/bgn085)
- [15] HECHT SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 559–603. [doi:10.1021/tx980005y](https://doi.org/10.1021/tx980005y)
- [16] SU T, BAO Z, ZHANG QY, SMITH TJ, HONG JY, et al. Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 2000; 60: 5074–9.
- [17] ZHANG X, CHEN Y LIU Y, REN X, ZHANG QY, et al. Single nucleotide polymorphisms of the human cyp2a13 gene: evidence for a null allele. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 1081–5. [doi:10.1124/dmd.31.9.1081](https://doi.org/10.1124/dmd.31.9.1081)
- [18] MOHELNIKOVA-DUCHONOVA B, VRANA D, HOLCATOVA I, RYSKA M, SMERHOVSKY Z, et al. CYP2A13, ADH1B and ADH1C Gene Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk. *Pancreas* 2009; 39: 144–8. [doi:10.1097/MPA.0b013e3181bab6c2](https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181bab6c2)
- [19] SINGH AP, SHAH PP, MATHUR N, BUTERS JT, PANT MC et al. Genetic polymorphisms in cytochrome P4501B1 and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat Res* 2008; 639: 11–9.
- [20] TRAVER RD, SIEGEL D, BEALL HD, PHILLIPS RM. Characterization of a polymorphism in NADP:H:quinone oxidoreductase DT-diaphorase. *Br J Cancer* 1997; 75: 69–75.
- [21] SARMANOVA J, SUSOVA S, GUT I, MRHALOVA M, KODET R, et al. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet* 2004; 12:848–54. [doi:10.1038/sj.ejhg.5201249](https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201249)
- [22] MENZEL HJ, SARMANOVA J, SOUCEK P, BERBERICH R, GRUNEWALD K, et al. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer* 2004, 90, 1989–1994. [doi:10.1038/sj.bjc.6601779](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601779)
- [23] FAGERHOLM R, HOFSTETTER B, TOMMISKA J, AALTONEN K, VRTEL R et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat. Genet.* 2008; 40: 844–53. [doi:10.1038/ng.155](https://doi.org/10.1038/ng.155)
- [24] BEGLEITER A, NORMAN A, LEITAO D, CABRAL T, HEWITT D, et al. Role of NQO1 polymorphisms as risk factors for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2005; 41: 927–33. [doi:10.1016/j.oraloncology.2005.05.004](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.05.004)
- [25] HARTH V, SCHAFFER M, ABEL J, MAINTZ L, NEUHAUS T, et al. Head and neck squamous-cell cancer and its association with polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism and repair. *J Toxicol Environ Health* 2008, A 71: 887–97.
- [26] MITROU PN, WATSON MA, LOKTIONOV AS, CARDWELL C, GUNTER MJ et al. Role of NQO1C609T and EPHX1 gene polymorphisms in the association of smoking and alcohol with sporadic distal colorectal adenomas: results from the UKFSS Study. *Carcinogenesis* 2007; 28, 875–82. [doi:10.1093/carcin/bgl194](https://doi.org/10.1093/carcin/bgl194)
- [27] HASSETT C, AICHER L, SIDHU JS, OMIECINSKI CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 421–8. [doi:10.1093/hmg/3.3.421](https://doi.org/10.1093/hmg/3.3.421)
- [28] ZIMNIAK P, NANDURI B, PIKULA S, BANDOROWICZ-PIKULA J. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994; 224: 893–9. [doi:10.1111/j.1432-1033.1994.00893.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00893.x)

- [29] WENGHOEFER M, PESCH B, HARTH V, BROEDE P, FRONHOFFS S, et al. Association between head and neck cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Arch Toxicol* 2003; 77: 37–41. [doi:10.1007/s00204-002-0414-y](https://doi.org/10.1007/s00204-002-0414-y)
- [30] LACKO M, ROELOFS HMJ, TE MORSCH RHM, VOOGD AC, OUDE OPHUIS MB, et al. Microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk for head and neck cancer. *Head Neck* 2008; 30: 836–44. [doi:10.1002/hed.20781](https://doi.org/10.1002/hed.20781)
- [31] ZHUO W, WANG Y, ZHUO X, ZHU Y, WANG W, et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk: association studies via evidence-based meta-analyses. *Cancer Invest* 2009; 27: 86–95. [doi:10.1080/07357900802146170](https://doi.org/10.1080/07357900802146170)
- [32] BUCH SC, NAZAR-STEWART V, WEISSFELD JL, ROMKES M. Case-control study of oral and oropharyngeal cancer in whites and genetic variation in eight metabolic enzymes. *Head Neck* 2008; 30: 1139–47. [doi:10.1002/hed.20867](https://doi.org/10.1002/hed.20867)
- [33] HABER PS, APTE MV, MORAN C, APPLGATE TL, PIROLA RC, et al. Nonoxidative metabolism of ethanol by rat pancreatic acini. *Pancreatol* 2004; 4: 82–9. [doi:10.1159/000077608](https://doi.org/10.1159/000077608)
- [34] VONLAUFEN A, WILSON JS, PIROLA RC, APTE MV, et al. Role of Alcohol Metabolism in Chronic Pancreatitis. *Alcohol Res Health* 2007; 30: 48–54.
- [35] HIRAKI A, MATSUO K, WAKAI K, SUZUKI T, HASEGAWA Y, et al. Gene-gene and gene-environment interactions between alcohol drinking habit and polymorphisms in alcohol-metabolizing enzyme genes and the risk of head and neck cancer in Japan. *Cancer Sci* 2007; 98: 1087–91. [doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00505.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00505.x)
- [36] LEE Ch, LEE JM, WU DC, GOAN YG, CHOU SH, et al. Carcinogenetic impact of ADH1B and ALDH2 genes on squamous cell carcinoma risk of the esophagus with regard to the consumption of alcohol, tobacco and betel quid. *Int J Cancer* 2008; 122: 1347–56. [doi:10.1002/ijc.23264](https://doi.org/10.1002/ijc.23264)
- [37] SOLOMON PR, SELVAM GS, SHANMUGAM G. Polymorphism in ADH and MTHFR genes in oral squamous cell carcinoma of Indians. *Oral Dis* 2008; 14: 633–9. [doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01437.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01437.x)
- [38] HASHIBE M, BOFFETTA P, ZARIDZE D, SHANGINA O, SZESZENIA-DABROWSKA N, et al. Evidence for an Important Role of Alcohol- and Aldehyde-Metabolizing Genes in Cancers of the Upper Aerodigestive Tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 696–703. [doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0710](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0710)
- [39] HOMANN N, STICKEL F, KÖNIG IR, JACOBS A, JUNG-HANN S, et al. Alcohol dehydrogenase 1C*1 allele is a genetic marker for alcohol-associated cancer in heavy drinkers. *Int J Cancer* 2006; 118: 1998–2002. [doi:10.1002/ijc.21583](https://doi.org/10.1002/ijc.21583)
- [40] PETERS ES, MCCLEAN MD, LIU M, EISEN EA, MUELLER N, et al. The ADH1C polymorphism modifies the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck associated with alcohol and tobacco use. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 476–82. [doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0431](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0431)

Příloha č. 7

Mohelnikova-Duchonova B, Oliverius M, Honsova E, Soucek P.

Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma.

Dis Markers. 2011 - přijato k publikaci. (IF₂₀₁₂ = 1,7)

Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma

Beatrice Mohelnikova-Duchonova^{a,b}, Martin Oliverius^c, Eva Honsova^d and Pavel Soucek^{a,*}

^aDepartment of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

^bFirst Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

^cDepartment of Transplantation Surgery, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

^dDepartment of Clinical and Transplantation Pathology, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Abstract. Histologically verified pairs ($n = 10$) of pancreatic tumors and non-neoplastic tissues were used for quantitative real-time PCR and the stability of 24 reference genes was analyzed with geNorm and NormFinder software. Raw C_q values correlated with the degree of RNA degradation. This correlation was abolished by normalization to C_q of 18S endogenous control gene. Both geNorm and NormFinder programs suggested *EIF2B1*, *ELF1*, *MRPL19*, and *POP4* as the same most stable genes. We have thus identified suitable reference genes for future expression studies in pancreatic carcinoma. Normalization method reducing the effects of RNA degradation on the quality of results was also developed.

Keywords: Pancreas, carcinoma, transcript, quantification, reference gene, normalization

1. Introduction

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer death in the United States [1] as well as in the Czech Republic [2]. It has a dismal five-year survival less than 5% [3], primarily related to the fact that disease-specific symptoms occur late in the course of the disease. Pancreatic cancer belongs to one of the most difficult conditions to treat [4] and its etiology and molecular pathogenesis is still poorly understood.

Gene expression profiles are commonly used for identification of groups of genes involved in specific functional aspects of tumor biology and for the development of candidate biomarkers [5]. A number of methods have been developed to study gene expression.

The relative quantification by real-time PCR method (qPCR) is adequate strategy for most purposes where investigation of physiological changes in gene expression levels is conducted [6–8]. There are several essential requirements for successful expression analysis. The first and crucial step is correct sample collection, handling and preparation [9]. By the time of diagnosis no more than 20% of patients with pancreatic carcinoma have surgically operable disease [10]. Thus, sampling in large specialized centers rather than in numerous smaller surgical departments is necessary for practical reasons. Typically, pancreatic tumors have low neoplastic cellularity and a predominance of non-neoplastic fibrous (or desmoplastic) stroma. This is rather unique to duct adenocarcinomas of the pancreas; in contrast to infiltrating carcinomas arising in other organs. To overcome this obstacle potentially leading to spurious results, two approaches are generally used. Firstly, microdissection or other methods of purification of the epithelial component are utilized. Second-

* Address for correspondence: Pavel Soucek, PhD., Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic. Tel.: +420 267082711; Fax: +420 267311236; E-mail: psoucek@szu.cz.

Table 1
Characteristics of the patient population

Sample	Date of diagnosis	Gender	Age at diagnosis	Surgery ^a	Stage	Lymph nodes ^b	Grade
PCI2	August 2008	female	54	head/R0	pT3N0M1	0/9	3
PCI4	August 2009	male	69	head/R0	pT3N0Mx	0/3	3
PCI5	November 2009	male	63	head/R0	pT3N1Mx	1/3	3
PCI7	December 2009	male	46	head/R0	pT3N1Mx	1/9	3
PCI8	December 2009	female	74	head/R0	pT3N1Mx	5/14	3
PCI9	December 2009	female	54	head/R1	pT2N1Mx	9/18	2
PCI10	December 2009	female	53	head/R0	pT4N1Mx	1/24	2
PCI12	January 2010	female	71	head/R0	pT2N0Mx	0/14	2
PCI15	February 2010	male	72	head/R0	pT2N0Mx	0/14	2
PCI17	May 2010	female	65	tail/R0	pT3N1Mx	1/23	3

^aAnatomical localization of tumor/radicality of surgery; ^bNumber of nodes with histologically confirmed metastasis/number of evaluated nodes.

ly, differences between macrodissected pancreatic tumors and non-neoplastic control tissues and eventually specimen from patients with chronic pancreatitis as an intermediate group are analyzed with stable cell lines as correctors [11]. In pancreatic tissues specifically, high-quality RNA preparation as the prerequisite condition for successful analysis presents an extremely difficult challenge. Subsequent assessment of RNA quality and quantity is the next critical step in expression analysis [6]. Pancreatic tissues contain a large amount of endogenous RNAses. RNAses are a major secretory product of normal pancreatic acinar cells and cause extensive degradation of mRNA in pancreatic tissues. Moreover, there is a frequent loss of acinar cells during development of infiltrating pancreatic cancers due to atrophy or destruction of the gland by the tumor growth [11]. The content of RNase secreting cells thus may vary among tumors. Thus for laboratories aiming at expression profiling of pancreatic cancer, it is essential to introduce specific protocol for the handling of a pancreatic specimen, RNA isolation procedure and rigorous control of RNA and cDNA quality and quantity. The appropriate choice of internal standards (reference genes) is critical for qPCR performance. Ideally, the internal standards should be constitutively expressed in all cell types under study. Internal standards should also be independent of experimental conditions and unaffected by human disease conditions. Formerly, a number of housekeeping genes, which are necessary for basic cell survival, like glucose-6-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), ribosomal RNA subunits (18S and 28S rRNA), β -actin or cyclophilins were used as reference genes. However, it has become clear that these highly popular reference genes show distinct differences in gene expression in certain tissue types and considerably vary between normal and malignant tissues [12–14].

The purpose of our study was to assess performance of 24 reference genes by qPCR in a series of 10 mac-

rodissected pairs of pancreatic carcinomas and adjacent non-neoplastic tissues. The robustness of qPCR analysis on samples with quality unavoidably compromised by RNA degradation was assessed as a major endpoint.

2. Material and methods

2.1. Samples

Tissue specimens were obtained from 10 surgically treated pancreatic carcinoma patients diagnosed over a period between August 2008 and May 2010. The resection specimens were immediately transferred from the Surgery to the Pathology Department, then macrodissected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA preparation. Histological diagnoses of pancreatic carcinomas including types, stages, and grades of the tumors were performed according to the rules for classification [15]. Only histologically confirmed tumor and non-neoplastic tissue samples were used for RNA analysis. The following data on patients were retrieved from medical records: age, sex, date of diagnosis, pTNM stage, histological type and grade of the tumor (Table 1). All patients were asked to read and sign an informed consent in accordance with the requirements of the Ethical Commission of the Institute of Clinical and Experimental Medicine in Prague.

2.2. Isolation of total RNA and cDNA synthesis

Tissue samples were homogenized by mechanical disruption using Precellys instrument (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) at a speed of 6,500 for 15 sec. Total RNA was isolated using Trizol Reagent according to manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stored at -80°C in

Table 2
Information about reference genes and the respective Assays

Gene symbol (ID)	Assay ID	Location of probe	Amplicon length (bp)	Gene name
<i>GAPDH</i> (2597)	Hs02758991_g1	3'-most, exon 7–8 boundary	93	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>HPRT1</i> (3251)	Hs99999909_m1	3'-most, exon 6–7 boundary	100	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
<i>GUSB</i> (2990)	Hs99999908_m1	3'-most, exon 11–12 boundary	81	glucuronidase, beta
<i>ACTB</i> (60)	Hs00357333_g1	exon 1–2 boundary	77	actin, beta
<i>B2M</i> (567)	Hs99999907_m1	3'-most, exon 2–3 boundary	75	beta-2-microglobulin
<i>HMBS</i> (3145)	Hs00609297_m1	3'-most, exon 1–2 boundary	64	hydroxymethylbilane synthase
<i>IPO8</i> (10526)	Hs00183533_m1 ^a	3'-most, exon 20–21 boundary	71	importin 8
<i>PGK1</i> (5230)	Hs00943178_g1 ^a	3'-most, exon 5–6 boundary	73	phosphoglycerate kinase 1
<i>TBP</i> (6908)	Hs00427621_m1 ^a	exon 3–4 boundary	65	TATA box binding protein
<i>TFRC</i> (7037)	Hs99999911_m1	exon 14	105	transferrin receptor
<i>YWHAZ</i> (7534)	Hs00237047_m1	exon 1–2 boundary	70	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
<i>PPIA</i> (5478)	Hs01565700_g1	exon 3–4 boundary	94	peptidylprolyl isomerase A
<i>POLR2A</i> (5430)	Hs00172187_m1 ^a	3'-most, exon 1–2 boundary	61	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A
<i>GADD45A</i> (1647)	Hs00169255_m1 ^a	exon 3–4 boundary	123	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
<i>EIF2B1</i> (1967)	Hs00426752_m1 ^a	3'-most, exon 4–5 boundary	75	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha
<i>ABL1</i> (25)	Hs00245445_m1 ^b	exon 3–4 boundary	91	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
<i>ELF1</i> (1997)	Hs00152844_m1 ^a	3'-most, exon 2–3 boundary	76	E74-like factor 1
<i>MRPL19</i> (9801)	Hs00608519_m1 ^a	exon 2–3 boundary	72	mitochondrial ribosomal protein L19
<i>PES1</i> (23481)	Hs00362795_g1 ^a	3'-most, exon 13–14 boundary	56	pescadillo homolog 1
<i>RPL30</i> (6156)	Hs00265497_m1 ^a	exon 4–5 boundary	149	ribosomal protein L30
<i>RPS17</i> (6218)	Hs02386586_g1	exon 2–3 boundary	88	ribosomal protein S17
<i>POP4</i> (10775)	Hs00198357_m1 ^a	exon 3–4 boundary	68	processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP subunit
<i>PSMC4</i> (5704)	Hs00197826_m1 ^a	exon 6–7 boundary	83	proteasome 26S subunit, ATPase, 4
18S (100008588)	Hs03928990_g1 ^a	not applicable	61	18S ribosomal RNA

^aassay recommended by the manufacturer (for criteria see www.appliedbiosystems.com);

^bBased on assay re-evaluation in August 2010 with NCBI Entrez Gene annotations, this assay may detect transcript(s) from off target gene(s) (see. www.appliedbiosystems.com).

aliquotes. RNA quantity was assessed in duplicates by Quant-iTTM RNA Assay Kit (Invitrogen) using Infinite M200 fluorescence reader (Tecan, Vienna, Austria). RNA quality was assessed by measurement of the RNA Integrity Number (RIN) using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and RNA Nano 6000 LabChip kit (Agilent Technologies). RNA with RIN above 2.0 was used for further processing. cDNA was synthesized using RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit with random hexamer primers according to manufacturer's protocol (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). For cDNA synthesis 2 μ g of total RNA were reverse-transcribed in a final reaction volume of 80 μ l, i.e. 25 ng/ μ l final concentration of cDNA at theoretical 100% efficiency. Quantity and quality of cDNA in terms of DNA contamination was then confirmed by PCR amplification of ubiquitin C fragment discriminating between products from

cDNA (190 bp) and from genomic DNA (1,009 bp) as described previously [16]. All cDNA samples that were free of DNA contamination (absence of 1,009 bp band in samples incubated without reverse transcriptase) were stored at -20°C until analysis.

2.3. Quantitative real-time PCR

qPCR was performed in 7500 Real-Time PCR System by help of TaqMan[®] Custom Plates (Applied Biosystems, Foster City, CA). For analysis of reference genes 4x24 well format was used comprising of TaqMan[®] Gene Expression Assays with optimized primer and probe sets (Table 2). The following criteria were applied to the selection of TaqMan[®] Gene Expression Assays: i/ exon-exon boundaries span where possible in order to minimize signals from traces of contaminating DNA, ii/ as short as possible amplicons

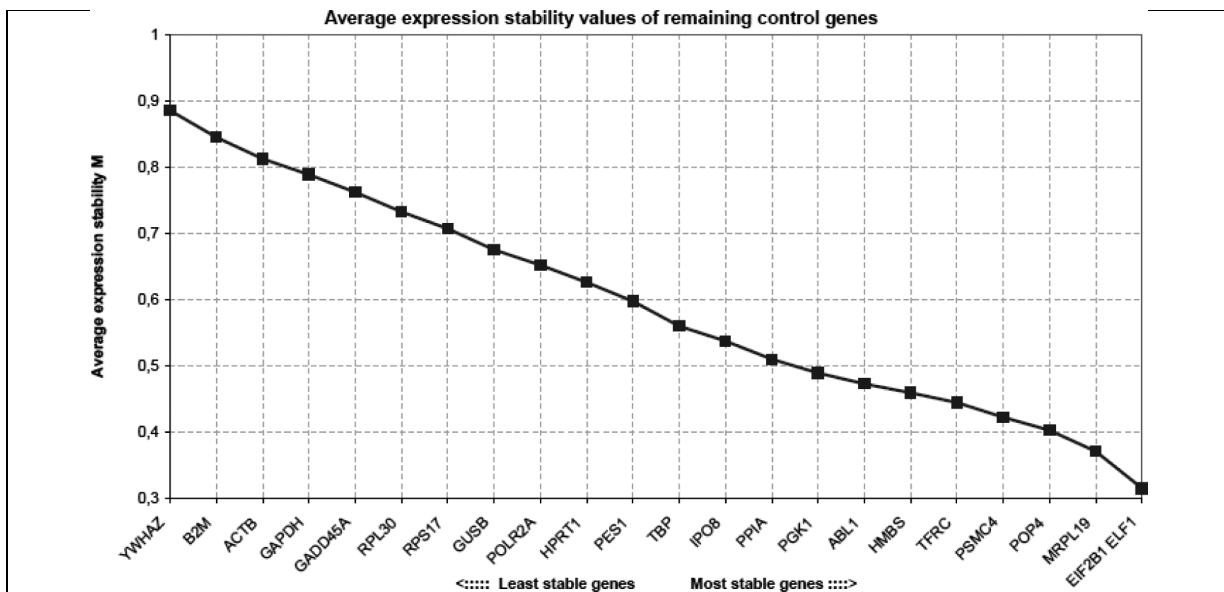


Fig. 1. Output from geNorm. Legend: Relative quantities for the respective genes described in Table 2 were input to geNorm program. The calculation of relative quantities is described in Material and Methods. The figure represents output from the program where genes with the lowest average expression stability value (M) are the most stable ones and may serve as suitable reference genes for study of the same type of samples. Genes located in the far right part of the x-axis were selected as candidates for reference genes. The underlying principles and calculations are described in Vandesompele et al. [17].

and iii/ location near to 3'-end of the transcript to reduce influence of RNA quality on qPCR. Priority was given to assays from the validated endogenous control set. The list of reference genes and respective assays is given in Table 2. Each reaction contained in total 20 μ l of premixed cDNA and 2x TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) in 1:1 ratio. The amount corresponding to 25 ng of total RNA used for cDNA synthesis was loaded per each sample well. Cycling parameters were: 2 min. at 50°C and initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing at 60°C for 60 sec.

2.4. Analyses of stability of reference genes

Firstly, ΔC_q was calculated for each sample where $\Delta C_q = C_q(\text{sample}) - C_q(\text{calibrator, i.e. non-neoplastic sample with the lowest average } C_q \text{ from all tested samples, i.e. ZPI5})$. Then relative quantity $Q = E^{\Delta C_q}$ where efficiency E was considered as 100%, i.e. $2^{\Delta C_q}$ value was calculated and used for analysis of stability of reference genes. The study design adhered to the MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) published in 2009 [9]. geNorm version 3.5 of March 2007 [17] and NormFinder version 19 of June 2009 [18] software

programs were used for evaluation of stability of reference genes according to manuals available at the website for their download. Differences between groups were analyzed by non-parametric Wilcoxon test and correlations were analyzed by non-parametric Spearman's test using SPSS version 15.0 software.

3. Results

3.1. RNA quantity and quality assessment

The total RNA was isolated from surgically removed tumor and non-neoplastic tissues of 10 patients with pancreatic carcinoma diagnosis. The median RIN of tumor and non-neoplastic tissue samples was 6.5 ± 1.0 (range 4.2–7.4) and of 3.3 ± 1.6 (2.1–6.5), respectively. RIN values differed significantly between tumors and non-neoplastic tissues ($p = 0.005$, Wilcoxon test). cDNA was synthesized using 2 μ g of total RNA. Samples free of genomic DNA contamination as assessed by PCR for ubiquitin C fragment were used for subsequent analyses.

3.2. Quantitative real-time PCR

We analyzed transcript levels of 24 candidates for reference genes for qPCR studies of pancreatic tumor

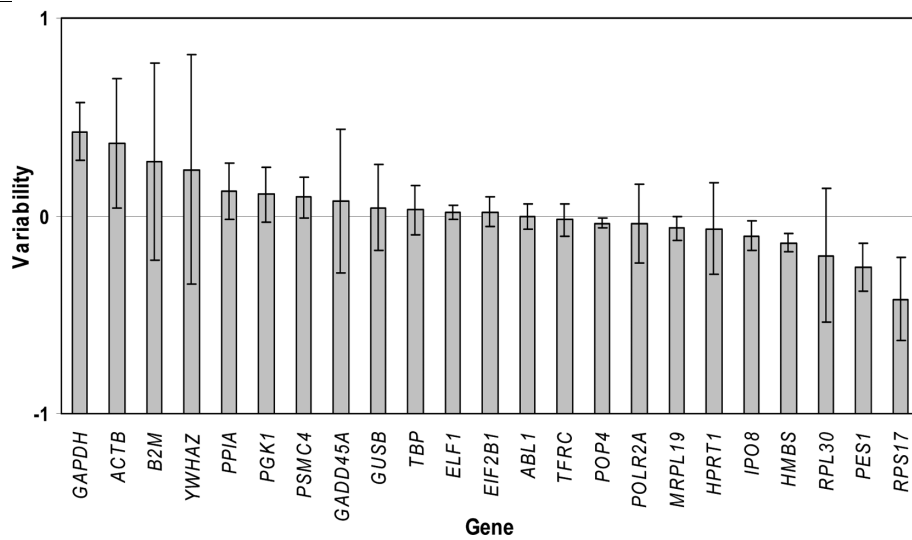


Fig. 2. Output from NormFinder. Legend: Relative quantities for the respective genes described in Table 2 were input to NormFinder program. The calculation of relative quantities is described in Material and Methods. The figure represents inter-group and intra-group variability among the tested samples. Candidate genes with an inter-group variation as close to zero as possible, and at the same time with the smallest errors bars possible were selected as suitable reference genes. These genes are highlighted by arrows in the figure. *TFRC* as alternative reference gene is highlighted by the grey arrow. The model and statistical framework underlying “NormFinder” are described in Andersen et al. [18].

and non-neoplastic tissue samples. The mean raw C_q values for all genes except 18S in tumors and non-neoplastic tissues were 27.06 ± 3.47 and 27.27 ± 2.88 , respectively. The median raw C_q values in tumors and non-neoplastic tissues were 27.02 and 27.24, respectively. The raw C_q values were highly dependent on the degree of RNA degradation represented by RIN. Significant correlation of RIN with the mean of raw C_q for all studied genes except 18S was observed in control tissues ($p = 0.010$, Fig. 3A). Non-significant trend was found in tumors ($p = 0.074$, Fig. 3A) and the effect became highly significant when all tissues were analyzed together ($R^2 = 0.57$, $p < 0.001$, data not shown). After normalization of data by calculation of $C_q(\text{reference gene})/C_q(18\text{S endogenous control gene})$ none of the correlations with RIN remained significant ($p = 0.253$ in controls, $p = 0.301$ in tumors, and $p = 0.841$ in all tissues; Fig. 3B).

3.3. Identification of reference genes

The relative quantity Q defined in Materials and Methods was used for analysis of stability of reference genes by geNorm and NormFinder. Sample ZPI5 with average $C_q = 25.27 \pm 2.44$ and RIN = 5.3 was used as calibrator. Both programs showed similar results, i.e. identified the same genes among the five most stable genes (*EIF2B1*, *ELF1*, *MRPL19* and *POP4*) and sug-

gested 2–3 reference gene combinations as sufficient for qPCR in pancreatic carcinoma. qPCR efficiency was then evaluated for the four best reference genes, i.e. *EIF2B1*, *ELF1*, *POP4* and *MRPL19* by assessment of serial dilutions of calibrator sample (ZPI5). Analysis of the efficiency, R^2 , and slope of calibration curves and C_q in non-template controls (NTCs) proved that all genes were suitable for further use in qPCR as reference genes (Table 3).

4. Discussion

Research of pancreatic cancer is hindered by difficulties with the recruitment of pancreatic cases with brief survival and poor performance status. Additionally, in inoperable patients (the majority in pancreatic cancer) the verification of diagnosis is complicated by the lack of pathological specimen. Moreover, pancreatic specimens present a hurdle in isolation of intact RNA due to the presence of high amounts of RNAses. Therefore, it is essential to validate the protocol of sample handling and RNA isolation from pancreatic tissues for qPCR purposes and minimize the effect of poor RNA quality. The aim of our study was to identify the most stable expressing endogenous control genes in tissue specimens from pancreatic cancer patients as potential reference genes for qPCR. Special attention was paid to the eval-

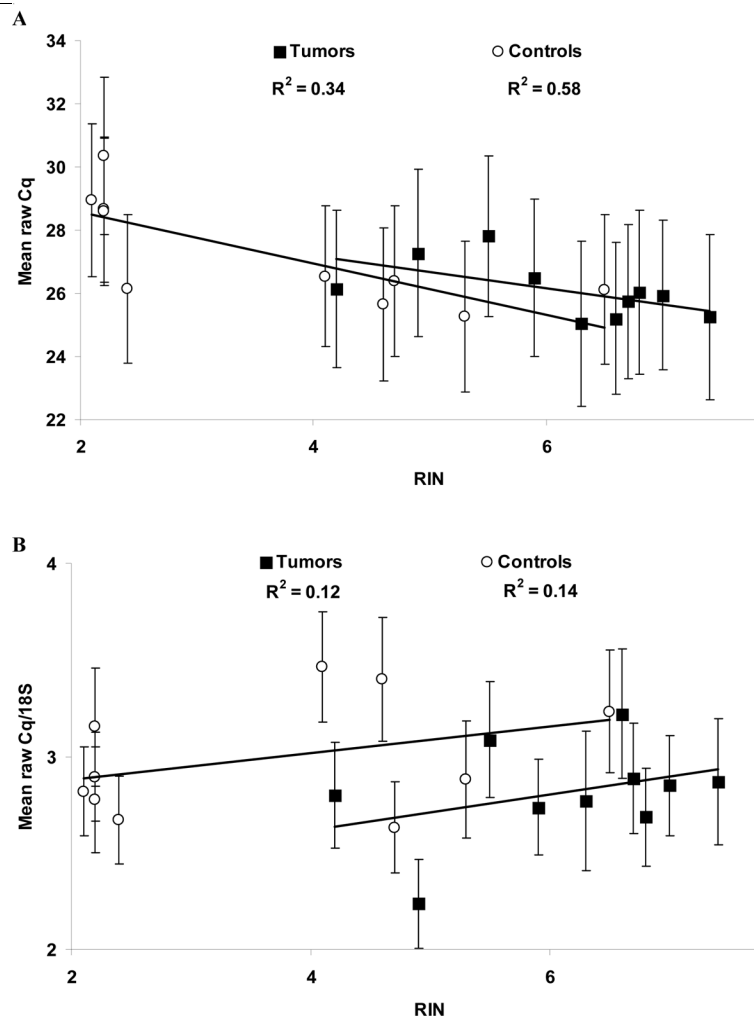


Fig. 3. Correlations between RIN and levels of reference genes. Legend: Mean \pm S.D. of raw Cq of all studied genes except 18S for each sample was plotted against RIN (A). Mean \pm S.D. of raw Cq/18S was plotted against RIN (B). Correlation coefficients and significances were calculated by the non-parametric Spearman test.

uation of the effect of RNA stability and assessment whether or not proper normalization can influence this effect.

We have found that under the same standard conditions of sample collection (tumor and non-neoplastic tissues macrodissected and snap frozen at the same time), storage and RNA isolation, the quality of RNA (by RIN comparison) from non-neoplastic pancreatic specimens is considerably lower than that from the respective tumor samples ($p = 0.005$). This was true for all of the inspected ($n = 10$) sample pairs and therefore we can speculate that the RNase content may generally be higher in non-neoplastic tissues. It is assumed that the ischemia time from ligation of the duodenal/pancreatic vessels to the withdrawal of tissue for

analysis is too long and causes massive RNA degradation. Since this ischemia time is an unalterable component of the operation, RNA analyses of pancreatic tissues present very difficult procedure [19]. For isolation of total RNA, Trizol Reagent-based procedure was used according to the recent literature [20,21]. Thus, the method of RNA isolation most probably did not cause the observed differences in RNA stability between samples. Our observation confirmed the previously published results that RNA isolated from solid tissues usually has the RIN between 6 and 8, but that from gastrointestinal tract has great RIN variation with RIN around 4 under experimental conditions with bovine organs [22]. The relatively low RIN values also precluded laser capture microdissection, which lowers the

Table 3
Performance of reference genes in qPCR

Sample	EIF2B1	MRPL19	ELF1	POP4
NTCs	> 40	> 40	> 40	> 40
Standard 1	22.02 ± 0.03	24.51 ± 0.01	19.59 ± 0.01	23.29 ± 0.02
Standard 2	23.24 ± 0.03	25.78 ± 0.04	20.59 ± 0.02	24.53 ± 0.02
Standard 3	24.52 ± 0.07	27.13 ± 0.04	21.75 ± 0.02	26.11 ± 0.01
Standard 4	26.81 ± 0.04	29.48 ± 0.12	24.14 ± 0.07	28.28 ± 0.04
Standard 5	29.24 ± 0.04	31.93 ± 0.14	26.68 ± 0.05	30.62 ± 0.08
Efficiency	98%	94%	98%	96%
Slope	-3.38	-3.48	-3.37	-3.43
R ²	0.999	0.999	0.999	0.998

cDNA of sample ZPI5 used for construction of the calibration curve was diluted 5-times (standard 1), 10-times (standard 2), 25-times (standard 3), 125-times (standard 4) and 625-times (standard 5). NTC (non-template control) consisted of water instead of cDNA. Samples were analyzed in triplicates (mean $C_q \pm$ S.D. shown).

RIN by 1–2 points in pancreatic specimens [21]. Fleige et al. [6] found a significant impact of RIN on results of expression analysis, mainly the quantification cycle (C_q , formerly C_t) and minor effect on PCR efficiency. Antonov et al. [23] demonstrated in a biologically homogenous system of intact and partially hydrolyzed RNA derived from a cell line that degradation-related shifts of C_q values can be compensated by calculating delta C_q values between test genes and the mean C_q values of several reference genes. These delta C_q values were less sensitive to fragmentation of the RNA and were unaffected by varying amounts of input RNA [23]. In our experimental setting RIN significantly correlated with mean raw C_q values of 24 tested genes. Therefore, we used normalization of data by calculation of $C_q(\text{reference gene})/C_q(18\text{S endogenous control gene})$. This normalization abolished the observed correlation with RIN. Thus, we demonstrated that the degradation-related C_q shifts caused by RNA fragmentation can be compensated by normalizing of the C_q of the reference gene and potentially the gene of interest to C_q of the endogenous 18S control gene.

We have screened 24 candidates for reference genes selected preferably from commercially available validated endogenous controls. There are several approaches for selection of most stable reference genes for qPCR in the literature, including the use of various programs for evaluation of results. In order to provide an overview of their performance, we have used two examples of the most frequently used software (NormFinder and geNorm) for evaluation of results. Both of these programs gave consistent results, although when rigorously evaluated, the most stable genes were not picked in the same order. However, *EIF2B1*, *ELF1*, *MRPL19* and *POP4* were among the first five most stable genes in both NormFinder and geNorm output. The ampli-

fication efficiency of target genes and reference genes should be tested before their use in relative quantification by qPCR. Slope and linearity of calibration curves should be analyzed as well [24]. We have shown that all selected genes perform well in qPCR (efficiency in the range 90–110%, $R^2 \geq 0.998$) and thus we recommend the use of these genes as reference genes for qPCR in pancreatic cancer research. Rubie et al. [25] tested 21 reference genes by qPCR in five gastrointestinal cancers. Tumor and normal tissues from 10 patients with pancreatic carcinoma were followed, amongst others. 18S-RNA, glutaminyl-tRNA synthetase (*QRS*), phosphomannomutase (*PMM1*), RNA polymerase II polypeptide L (*POLR2L*) and β -glucuronidase (*GUSB*) showed the most stable expression. Analysis of agarose gel electrophoretic profiles was used as RNA quality control instead of RIN. In this study the comparative ΔC_q method was used. Results were then transformed to linear form by calculation of $2 - \Delta C_q$ (mean C_q pathological tissue-mean C_q calibrator) [25]. Our study of the same size ($n = 10$) considered a bit different selection of genes (7 of 21 previously used genes were included in our study). However, *GUSB* was not confirmed among the five most stable genes by any of the programs used in our study. *HPRT*, *GAPDH*, *PGK1*, *ACTB*, and *B2M* did not perform well in both our and the previous study [25].

The published microarray data contain more than 2,500 potential reference genes [26]. It seems intriguing to compare the results of this study with appropriate selection of the most stable reference genes from microarray data. However, the recently discussed incomplete information on tissue composition and/or the use of well-defined tissues severely hampers any meaningful microarray data analysis and conclusive data interpretation [27]. In context with the fact that repeatabil-

ity of microarray data is considered limited [28] such comparison may be an interesting goal for future investigations after major shortcomings are resolved.

In conclusion, we have identified four potential candidates as reference genes for future qPCR studies in pancreatic cancer research. We also suggest the normalization method which may reduce the effect of poor RNA quality on the quality of results.

Acknowledgements

This study was supported by grants of Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, grant no. 9799-4 and 10230-3.

References

- [1] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu et al., Cancer statistics 2010, *CA Cancer J Clin* **60** (2010), 277–300.
- [2] IHIS CR, Cancer Incidence 2006 in the Czech Republic, Czech Republic, 2009.
- [3] M. Hidalgo, Pancreatic cancer, *New Engl J Med* **362** (2010), 1605–1617.
- [4] M.J. Moore, D. Goldstein, J. Hamm et al., Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer, a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, *J Clin Oncol* **25** (2007), 1960–1966.
- [5] C. Rosty, T. Ueki, P. Argani et al., Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation, *Am J Pathol* **160** (2002), 45–50.
- [6] S. Fleige, V. Walf, S. Huch et al., Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR, *Biotechnol Lett* **28** (2006), 1601–1613.
- [7] M. Hubackova, R. Vaclavikova, M. Mrhalova et al., NAD(P)H, quinone oxidoreductase 1 Pro187Ser polymorphism and expression do not co-segregate with clinico-pathological characteristics of human mammary tumors, *Pharmacogenet Genomics* **19** (2009), 505–512.
- [8] M. Hubackova, R. Vaclavikova, M. Ehrlichova et al., Association of superoxide dismutases and NAD(P)H oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas, *Int J Cancer* (2011), Feb 23. doi, 10.1002/ijc.26006.
- [9] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson et al., The MIQE guidelines, minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin Chem* **55** (2009), 611–622.
- [10] C. Sharma, K.M. Eltawil, P.D. Renfrew et al., Advances in diagnosis, treatment and palliation of pancreatic carcinoma: 1990–2010, *World J Gastroenterol* **17** (2011), 867–897.
- [11] F. Vilardell and C.A. Iacobuzio-Donahue, Cancer gene profiling in pancreatic cancer, *Methods Mol Biol* **576** (2010), 279–292.
- [12] H. Zhong and J.W. Simons, Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia, *Biochem Biophys Res Commun* **259** (1999), 523–526.
- [13] C. Blanquicett, M.R. Johnson, M. Heslin et al., Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues, applications in pharmacogenomic gene expression studies, *Anal Biochem* **303** (2002), 209–214.
- [14] V.P. Mane, M.A. Heuer, P. Hillyer et al., Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis, *J Biomol Tech* **19** (2008), 342–347.
- [15] F.L. Greene, A. Trotti III, A.G. Fritz, C.C. Compton, D.R. Byrd and S.B. Edge, eds, AJCC Cancer Staging Handbook – 7th ed., 2010, American Joint Committee on Cancer, Chicago, IL, USA, 2009.
- [16] P. Soucek, P. Anzenbacher, I. Skoumalova et al., Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells, *Stem Cells* **23** (2005), 1417–1422.
- [17] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol* **3** (2002), research0034.1–0034.11.
- [18] C.L. Andersen, J.L. Jensen and T.F. Ørntoft, Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data, A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets, *Cancer Res* **64** (2004), 5245–5250.
- [19] S.T. Mees, W.A. Mardin, C. Wendel et al., EP300-a miRNA-regulated metastasis suppressor gene in ductal adenocarcinomas of the pancreas, *Int J Cancer* **126** (2010), 114–124.
- [20] D. Li, W. Ren, X. Wang et al., A modified method using TRIzol reagent and liquid nitrogen produces high-quality RNA from rat pancreas, *Appl Biochem Biotechnol* **158** (2009), 253–261.
- [21] U. Rudloff, U. Bhanot, W. Gerald et al., Biobanking of human pancreas cancer tissue: impact of ex-vivo procurement times on RNA quality, *Ann Surg Oncol* **17** (2010), 2229–2236.
- [22] S. Fleige and M.W. Pfaffl, RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance, *Mol Aspects Med* **27** (2006), 126–139.
- [23] J. Antonov, D.R. Goldstein, A. Oberli et al., Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization, *Lab Invest* **85** (2005), 1040–1050.
- [24] K.J. Livak and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-deltaCt methods, *Methods* **25** (2001), 402–408.
- [25] C. Rubie, K. Kempf, J. Hans et al., Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues, *Mol Cell Probes* **19** (2005), 101–109.
- [26] C.W. Chang, W.C. Cheng, C.R. Chen et al., Identification of human housekeeping genes and tissue-selective genes by microarray meta-analysis, *PLoS One* **6** (2011), e22859.
- [27] E. Gadaleta, R.J. Cutts, G.P. Kelly et al., A global insight into a cancer transcriptional space using pancreatic data: importance, findings and flaws, *Nucleic Acids Res* **39** (2011), 7900–7907.
- [28] J.P. Ioannidis, D.B. Allison, C.A. Ball et al., Repeatability of published microarray gene expression analyses, *Nat Genet* **41** (2009), 149–155.

Příloha č. 8

Hlavata I, **Mohelnikova-Duchonova B**, Vaclavikova R, Liska V, Pitule P, Novak P, Bruha J, Vycital O, Holubec L, Treska V, Vodicka, P, Soucek P.

The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer.
Mutagenesis. 2012;27(2):187-96. (IF₂₀₁₂ = 4,0)

The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer

I. Hlavata^{1,2}, B. Mohelnikova-Duchonova¹,
R. Vaclavikova¹, V. Liska³, P. Pitule³, P. Novak³, J. Bruha³,
O. Vycital³, L. Holubec⁴, V. Treska³, P. Vodicka⁵ and
P. Soucek^{1,*}

¹Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic, ²Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruska 87, Prague 10, 100 00 Czech Republic, ³Department of Surgery, ⁴Department of Oncology, Teaching Hospital and Medical School Pilsen, Charles University in Prague, Alej svobody 80, Pilsen, 304 00, Czech Republic, ⁵Department of the Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine, Academy of Science, Videnska 1083, Prague 4, 142 20 Czech Republic

*To whom correspondence should be addressed. Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic. Tel: +420 267082711; Fax: +420 267311236; Email: psoucek@szu.cz

Received on August 3, 2011; revised on September 23, 2011;
accepted on September 27, 2011

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer, with the highest mortality rates occurring in Central Europe. The use of chemotherapy to treat CRC is limited by the inter-individual variability in drug response and the development of cancer cell resistance. ATP-binding cassette (ABC) transporters play a crucial role in the development of resistance by the efflux of anticancer agents outside of cancer cells. The aim of this study was to explore transcript levels of all human ABCs in tumours and non-neoplastic control tissues from CRC patients collected before the first line of treatment by 5-fluorouracil (5-FU)-containing regimen. The prognostic potential of ABCs was evaluated by the correlation of transcript levels with clinical factors. Relations between transcript levels of ABCs in tumours and chemotherapy efficacy were also addressed. The transcript profile of all known human ABCs was assessed using real-time polymerase chain reaction with a relative standard curve. The majority of the studied ABCs were down-regulated or unchanged between tumours and control tissues. ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCC1, ABCC2 and ABCE1 were up-regulated in tumours versus control tissues. Transcript levels of ABCA12, ABCC7 and ABCC8 increased in direction from colon to rectum. Additionally, transcript levels of ABCB9, ABCB11, ABCG5 and ABCG8 followed the reverse significant trend, i.e. a decrease in direction from colon to rectum. The transcript level of ABCC10 in tumours correlated with the grade ($P = 0.01$). Transcript levels of ABCC6, ABCC11, ABCF1 and ABCF2 were significantly lower in non-responders to palliative chemotherapy in comparison with responders. The disease-free interval of patients treated by adjuvant chemotherapy was significantly shorter in patients with low transcript levels of ABCA7, ABCA13, ABCB4, ABCC11 and ABCD4. In conclusion, ABCC11 may be a promising candidate marker for a validation study on 5-FU therapy outcome.

Introduction

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer, with an estimated 1 233 700 newly diagnosed cases and 608 700 deaths/year in 2008. For this type, Central Europe has repeatedly recorded the highest mortality rates (1).

Although inherited susceptibility underlies roughly 35% of variance in CRC risk (2), germ line mutations in genes with high penetrance account for <6% of cases (3). There is growing evidence that lifestyle and environmental factors contribute to the CRC development (4).

Systemic chemotherapy is an important component of the complex treatment of CRC, with regimens based on 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan and/or oxaliplatin used as standard. These drugs are often used in combination with biological therapy in patients with advanced disease. Generally, the use of chemotherapy to treat cancers is limited by the inter-individual variability in drug response and the development of cancer cell resistance. Xenobiotics, including anticancer drugs, are extensively metabolised in the body by Phase I (activation enzymes, e.g. cytochromes P450) and Phase II (conjugation enzymes as glutathione *S*-transferases, GSTs, or glucuronide transferases, UGTs) enzymes. Phase III of biotransformation represented by ATP-binding cassette (ABC) transporters presents another important component of xenobiotic metabolism (5). ABC transporters play a crucial role in the development of resistance by the efflux of anticancer agents outside of cancer cells (6). In fact, the expression of ABCs may significantly vary among individuals and thus affects the efficacy of drug treatment (7).

The human ABC transporters are encoded by a large transporter gene superfamily, which is composed of 49 members grouped into seven subfamilies (A–G) according to the sequence homology. ABC proteins facilitate translocation of heterogeneous substrates including metabolic products, lipids and sterols, peptides and proteins, saccharides, amino acids, inorganic and organic ions, metals and drugs across the cell membrane. To transport these substrates across extracellular and intracellular membranes against a concentration gradient, ABCs use energy acquired by the hydrolysis of ATP (8). Genetic variation in these genes causes a variety of genetic diseases and disorders (9). The structure of ABC transporters consists of two types of domains: ATP-binding domains, also known as nucleotide-binding folds (NBFs) and transmembrane domains (TMDs). The NBFs contain typical motifs: Walker A and Walker B and so-called ABC-signature sequence. The TMDs are formed by 6–11 alpha helices and provide the substrate specificity (10). Although all share a similar NBF, their domains are organised in different ways, with different numbers and localisations of TMDs (11). Some of the ABCs behave as full transporters with two TMDs, each with six transmembrane segments, and two NBFs. Others are half transporters with only one TMD and become functional after dimerisation or oligomerisation (12).

The ABCA subfamily contains 12 members acting as full transporters (13; supplementary Table IS, available at *Mutagenesis* Online). ABCA5 mRNA was detected in poorly differentiated colon adenocarcinoma cell lines G-112 but not in normal colon. In contrast, ABCA2 mRNA was detected in well-differentiated colon adenocarcinoma cell lines CX-1. Thus, induction of ABCA5 may correlate with the differentiation status of human colon tumours and contribute to the tumour development (14).

The ABCB subfamily consists of 11 members (supplementary Table IIS, available at *Mutagenesis* Online). Four of them are full transporters (ABCB1, ABCB4, ABCB5 and ABCB11) and the rest is composed of half transporters. P-glycoprotein, a product of *ABCB1* gene, is localised in epithelial cells of the small and large intestine as a part of the barrier that protects cells against xenobiotics from diet, bacterial toxins, drugs and other biologically active compounds (15). ABCB1 confers MDR phenotype to cancer cells (16). ABCB1 substrates are generally amphipathic lipid-soluble compounds including anticancer drugs as *vinca* alkaloids, anthracyclines, taxanes, epipodophyllotoxins, camptothecins or anthracenes (17). Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *ABCB1* have been shown to influence its phenotype (expression, protein function and drug response) in context with numerous diseases [(11,18,19); supplementary Table VS, available at *Mutagenesis* Online]. ABCB1 is highly expressed in the apical membrane of enterocytes, where it pumps xenobiotics back into the intestinal lumen. No relationship was seen between ABCB1 protein expression, genotype and long-term prognosis of patients treated by 5-FU and leucovorin (20). Hypoxia is generally associated with chemoresistance. Ding *et al.* (21) suggested that hypoxia induced the expression of hypoxia-inducible factor, alpha subunit and ABCB1 in colon carcinoma. Complementary DNA (cDNA) microarray analysis of cell sublines derived from K562 leukaemia, MCF7 breast cancer and S1-colon cancer with acquired resistance against daunorubicin, doxorubicin, vincristine, etoposide and mitoxantrone has shown that ABCB1, ABCB4 and ABCG2 were up-regulated in several resistant sublines (22). ABCB2 and ABCB3 expressions were significantly associated with major histocompatibility complex class I antigen (MHC1) expression in 336 sporadic CRC tumours examined by immunohistochemistry. Thus, the expression of key components of the antigen-processing machinery represented by ABCB2 and ABCB3 is linked with the density of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs), which are positive prognostic factors in CRC *in vivo* (23).

The ABCC family contains 13 members; nine of them are the multidrug resistance-associated proteins (MRPs; ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC10, ABCC11 and ABCC12, supplementary Table IIIS, available at *Mutagenesis* Online). *In vitro* ABCC transporters can collectively confer resistance to anticancer drugs and their conjugated metabolites, platinum compounds, folate antimetabolites, nucleoside and nucleotide analogues (24). ABCC1 and ABCC2 have been shown to act synergistically with several Phase II enzymes including GSTs and UGTs and this synergy conferred resistance to several drugs (25,26). ABCC1 exports drug conjugates with glutathione and unconjugated drugs together with free glutathione (17). By contrast, ABCC2 transports a wide range of unconjugated organic anions, including e.g. methotrexate, irinotecan or ampicillin (27). ABCC2 haplotype predicted variability in

pharmacokinetics of irinotecan in Japanese metastatic CRC patients treated by FOLFIRI (regimen containing 5-FU and irinotecan) (28). mRNA expression of ABCC2 was significantly associated with resistance to cisplatin but not 5-FU (29). 5-FU significantly suppressed ATP7B and the organic cation transporter SLC22A2 and increased ABCC2 mRNA expression (5.8-fold) in human cells from colon adenocarcinoma (LS180). Overexpression of ABCC2, ABCC3 and ABCG2 was demonstrated to be beneficial for the efficacy of oxaliplatin in Madin-Darby canine kidney II cells (MDCKII). Thus, the authors predicted that the modulation of expression of transporters of both drugs could favour the synergic action of the FOLFOX (5-FU/leucovorin/oxaliplatin) combination (30). ABCC5 protein confers resistance to 5-FU by the efflux of monophosphate metabolites. The overexpression of ABCC5 in CRC may contribute to the resistance to 5-FU (31). In cell lines, celecoxib induced ABCC4 and ABCC5 expression at both mRNA and protein levels, but no induction of ABCC1 and ABCC2 was found. This observation suggested that the low response rate observed in clinical trials using combinations of celecoxib with 5-FU or irinotecan may reflex celecoxib-mediated induction of efflux of drugs from cancer cells through the up-regulation of ABCs (32). Interestingly, patients treated with oxaliplatin- and 5-FU-based regimen for metastatic CRC ($n = 40$) had a significantly shorter progression-free survival in the case where their circulating tumour cells (CTCs) expressed alcohol dehydrogenase (ALDH) 1, survivin and ABCC5. Thus, detection of survivin+/ABCC5+ CTCs from peripheral blood may help in identifying metastatic CRC patients resistant to standard oxaliplatin- and/or 5-FU-based regimen (33). ABCC11 shares the highest structural similarity with ABCC4 and ABCC5. ABCC11 was also shown to confer resistance to 5-FU and certain fluoropyrimidines (supplementary Table IIIS, available at *Mutagenesis* Online). The rs17822931 SNP in *ABCC11* affects enzyme function that determines earwax type (34).

The ABCD subfamily consists of four half transporters localised in peroxisomes, providing thus peroxisomal transport of long-chain fatty acids (supplementary Table IVS, available at *Mutagenesis* Online). ABCE and ABCF subfamilies contain genes that are clearly derived from ABC transporters and have ATP-binding domains but not TMDs (35, supplementary Table IVS, available at *Mutagenesis* Online). There are currently no data available on the role of ABCD and ABCF subfamilies in CRC.

The six known members of ABCG subfamily are half transporters that have a reversed structure. N-terminus contains NBF and TMD is at the C-terminus (supplementary Table IVS, available at *Mutagenesis* Online). ABCG2 is a multidrug resistance enzyme that can export both unmodified drugs and drug conjugates, including mitoxantrone, bisantrene, epipodophyllotoxins (e.g. etoposide), camptothecins (topotecan and irinotecan) or flavopiridol (17). Patients harbouring the -19572 to 19569delCTCA mutation in *ABCG2* had a significantly lower relative extent of conversion of irinotecan to its SN-38 metabolite than patients carrying the ancestral genotype without this deletion ($P = 0.019$; 36). Dietrich *et al.* (37) examined 29 colon adenomas from 21 patients and 8 adenomas from C57BL/6 *Apc*^{Min/+} mice. ABCG2 protein was significantly down-regulated in both human and mice colon adenomas. ABCG2 confers resistance to a narrower range of anticancer agents than ABCB1 and ABCC1 or ABCC2, e.g. anthracyclines, mitoxantrone and irinotecan. ABCG2 transports the glucuronide conjugate of SN-38, the active metabolite of irinotecan, but with ~7-fold lower affinity than unconjugated

SN-38 (38). Dye-efflux effective side population (SP) of SW480 colon cancer cells has shown a higher resistance to 5-FU and irinotecan, higher ABCB1 and ABCG2 expressions and activation of the Wnt signalling pathway when compared to non-SP containing cells. Silencing the Wnt signalling pathway may thus present a promising strategy for targeting chemotherapy-resistant CRC cells (39). The ABCG5 and ABCG8 form heterodimers and overexpression of putative stem cell marker EpCAM with ABCG5 within the buds of colorectal tumours is frequently observed and associated with poor prognosis (40).

The current state of knowledge shows that ABCs are functionally important for anticancer drug disposition and efficacy. However, apart from functional data obtained using cell and animal models, there is a limited amount of information on the importance of ABCs for the prognosis of individual patients and the prediction of the chemotherapy outcome. Some of the published studies in patients suggested that ABCs may influence not only cancer initiation but also its progression, invasion and metastasis. The aim of our study is to: (i) explore transcript levels of ABCs in tumour and control tissues from CRC patients treated by substrates of ABCs, (ii) evaluate prognostic potential of ABCs by the correlation of transcript levels with clinical factors such as tumour size, lymphatic node involvement and grading and (iii) elucidate relations between transcript levels of ABCs in tumours and chemotherapy efficacy. In our pilot study presented here, we have addressed these points in a complex way by an assessment of the transcript profile of all known human ABCs. This is because some of the drugs under study are transported by numerous and in some cases unknown transporters. The selection and validation of candidate genetic markers identified in the pilot study are the final goal of our current research.

Materials and methods

Materials

Phenol, chloroform, agarose and chemicals for preparation of buffers were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). Deoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) for polymerase chain reaction (PCR), molecular weight standard for electrophoresis Φ X174DNA-HaeIII digest and Lambda DNA EcoRI + HindIII Marker were products of New England Biolabs Inc (Ipswich, MA, USA) and Fermentas Inc (Vilnius, Lithuania), respectively. Taq-Purple DNA polymerase and Combi PPP Master Mix for PCR were supplied by Top-Bio s.r.o. (Prague, Czech Republic).

Subjects

Tissue samples of primary tumour of human colorectal carcinoma and paired distant unaffected mucosa were collected from CRC patients diagnosed and treated at the Departments of Surgery and Oncology, at the Teaching Hospital and Medical School in Pilsen and Charles University in Prague, both in the Czech Republic during the period 2008–10. Native tissue samples were taken during surgery, macrodissected, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA isolation. The control mucosa samples were taken from the macroscopically unaffected resection margins of colon tissues. The resection margins were microscopically evaluated and only samples free of malignant cells were further analysed. Corresponding tumour tissue samples were verified by the experienced pathologist. Only histologically verified patients and their samples were included in this study. The following data on patients were retrieved from medical records: age, gender, date of diagnosis, pTNM stage according to Union for International Cancer Control (41), histological type and grade of the tumour, type of chemotherapy and treatment response.

The following eligibility criteria were applied to the recruitment of patients into the study: (i) patients who were subject to surgery for CRC, (ii) no prior chemotherapy before surgery (in order to eliminate its influence on transcript levels), (iii) patients who received only first-line chemotherapy in either palliative (Group A) or adjuvant (Group B) setting and (iv) patients who received regimens based on 5-FU, leucovorin and/or oxaliplatin, e.g. FOLFOX.

Response to the treatment was evaluated by Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) criteria (42) based on routinely used imaging techniques for assessment of tumour mass (by computer tomography, with or without positron emission tomography, magnetic resonance or ultrasonography).

Increase in tumour mass or the appearance of new lesions in patients with palliative treatment (Group A) indicated progression and thus no response to the treatment. Response to the treatment was defined as a decrease of the number or volume of metastases or stabilisation of the disease.

In patients treated by adjuvant therapy after radical surgical resection R0 (Group B), disease-free interval (DFI) served as the treatment outcome for analyses. DFI was defined as the time elapsed between radical surgical R0 resection and disease recurrence. CRC patients treated by 5-FU and/or oxaliplatin were monitored for adverse symptoms of treatment and toxicity was scored according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, Version 2, during the whole period of treatment. Grade 3 or 4 toxicity was followed as an important factor of toxicity of the administered regimens.

All patients were informed about the study aims, methods and potential risks and signed consensually an informed consent form in agreement with the requirements of the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic.

Isolation of total RNA and cDNA preparation

Methods were published (19,43) and are presented in the supplementary Material, available at *Mutagenesis* Online.

Quantitative real-time PCR

The diluted amplified cDNA was used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) by the relative standard curve method performed in 7500 and ViiA7 Real-Time PCR System using TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies). The following criteria were applied to the selection of TaqMan Gene Expression Assays: (i) exon–exon boundaries span where possible, in order to minimise signals from traces of contaminating DNA, (ii) as short as possible amplicons and (iii) location near to 3'-end of the transcript to reduce possible influence of RNA quality on qRT-PCR. The list of reference genes, genes of interest and respective assays is given in supplementary Table VIS, available at *Mutagenesis* Online. Cycling parameters of qRT-PCR were initial hold at 50°C for 2 min and initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing at 60°C for 60 sec (except ABCC9, ABCG4 and ABCG5 where 90°C for 90 sec and ABCB1 where 58°C for 90 sec were used). Each reaction contained 2.5 μl of 20 times diluted preamplified cDNA, 5 μl of TaqMan Gene Expression Master Mix and 0.5 μl of TaqMan Gene Expression Assay in a final reaction volume of 10 μl . Fluorescence was acquired after each extension step. Each sample was assessed in duplicate and the mean value was used for further analyses. Samples with $>15\%$ variation between duplicates were reanalysed. The non-template control contained water instead of cDNA. Negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were also employed to reveal possible carry-over contamination. One sample of normal colon mucosa was used as calibrator for preparation of standard curves for each gene to assess reaction efficiency. For the real-time PCR reactions, preamplified cDNA of the calibrator diluted 1:4 was used as the highest template concentration point for construction of the standard curve. The rest of the standard curve points were prepared by five subsequent serial five times dilutions. The resulting standard curve was used for calculation of PCR efficiency (E) according to the following formula: $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ (supplementary Table VIS, available at *Mutagenesis* Online). Reference genes were selected on the basis of our pilot study, where the TaqMan Array Plates (Life Technologies) were used to compare the stability of 24 different potential reference genes chosen from the literature in a set of 10 pairs of human CRC tumours and distant unaffected mucosa samples. Stability of reference genes was analysed by geNorm version 3.5 of March 2007 (44) and NormFinder version 19 of June 2009 (45) software programs. According to both programs, EIF2B1, MRPL19, PSMC4, POLR2A, PPIA and HPRT1 were selected as the most stable genes for normalisation of transcript levels of target genes. The qRT-PCR study design adhered to the MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments; 46).

Statistical analyses

Transcript levels were analysed by 7500 and ViiA7 System Software. Acquired average C_T values were further processed by relative expression software tool (REST) 2009 Software (47; Qiagen, Hildesheim, Germany). REST is routinely used for the determination of differences between different types of sample and control groups and considers both normalisation to numerous reference genes and reaction efficiency. For statistical analyses of correlation of transcript levels of all established genes with clinical data, the non-parametric tests as Mann–Whitney, Kruskal–Wallis and Spearman rank tests were used according to the

distribution of data. The mean, median, SD, variance, minimum, maximum, quantiles, frequencies and other basic statistical measurements were computed in the given groups and subgroups. The relations between the parameters were computed by Spearman correlation coefficient. The DFI analyses were performed by Kaplan–Meier Survival estimates and Cox regression hazard model. In the first step, each of the investigated covariates were divided into four groups using quartiles of the investigated variable. For these groups, the Kaplan–Meier survival functions were computed. All possible cut-offs were tested and the ‘optimal cut-off’ was defined as the highest statistical significance in Kaplan–Meier (log-rank test). For these cut-offs, the hazard ratios (HRs) were then computed. In order to reduce the chance of Type I and II errors, only the cut-offs, where the DFI divided by quartiles had a similar direction to the DFI, were used. *P*-values are always departures from two-sided tests. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses of clinical data were performed using SPSS v15.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Results

Fifty-one patients meeting the eligibility criteria were recruited into the study (26 patients in the palliative Group A and 25 patients in the adjuvant Group B). The clinical and pathological characteristics of the patients are listed in Table I. Patients in both groups did not significantly differ in terms of gender, age at diagnosis, tumour size, lymph node involvement and grading. On the other hand, patients significantly differed in metastatic spread of the disease (all patients in the palliative group were M1 versus M0 in all adjuvant patients) and subsequent treatment (the palliative group was treated predominantly by more aggressive FOLFOX regimen). Tumour localisation also significantly differed between both groups (rectum prevailed in the palliative group versus adjuvant group,

P = 0.008). The median of follow-up was 20 months. Neither the median overall survival nor the median DFI was reached. Therefore, the importance of transcript levels of ABCs for overall survival was not evaluated. DFI was evaluated as a measure of short-term survival; 72% of censors occurred in the course of follow-up.

Differences in transcript levels of ABCs between tumour and control tissues

A large number of ABC transcripts were down-regulated in tumour versus control mucosa tissues (REST 2009 software, Table II). Among these, ABCA1, ABCA4, ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9, ABCA10, ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB11, ABCC3, ABCC5, ABCC6, ABCC7, ABCC8, ABCC13, ABCD2, ABCD3, ABCD4, ABCG1 and ABCG2 transcripts were down-regulated at a very high level of significance (*P* ≤ 0.001). Contrastingly, ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCC1, ABCC2 and ABCE1 were up-regulated in tumours versus control tissues to a high extent (Table II). The remaining ABCs did not show significant deregulation in compared tissues. Transcript level of ABCC12 was below the limit of detection in all samples.

Correlations between transcript levels of ABCs in tissues and clinical data

Relative transcript levels of ABCs were first normalised to six reference genes. Average *C_T* value of EIF2B1, MRPL19, PSMC4, POLR2A, PPIA and HPRT1 transcript levels was calculated for each sample and designated as ENDO value.

Table I. Clinical characteristics of studied groups

	Group A (palliative), <i>n</i> = 26	Group B (adjuvant), <i>n</i> = 25	<i>P</i> ^a
Gender (males/females)	19/7	16/9	0.555 (Fisher's exact test)
Age at diagnosis (years), median ± SD	64.5 ± 9.7	63.0 ± 8.5	0.676 (ANOVA)
Tumour size (T)			0.798
T2	2	2	
T3	19	20	
T4	5	4	
Lymphnodes involvement (N)			0.856
N0	7	7	
N1	11	11	
N2	8	7	
M classification			<0.001
M0	0	25	
M1	26	0	
Grade			0.361
G1	4	2	
G2	21	18	
G3	1	5	
Primary tumour localisation			0.008
Colon	8	17	
Rectosigmoideum	6	6	
Rectum	12	2	
Chemotherapy			0.006 (Fisher's exact test)
5-FU ± leucovorin ^b	6	12	
FOLFOX	20 ^c	13	
Grade 3 or 4 toxicity	1	3	
Post-operative radiotherapy	3	4	0.477
Chemotherapy outcome			NA
Responders/non-responders	13/13	NA	
Relapse/remission	NA	7/18	

Footnotes:

^aAnalysed by Pearson chi-square test. The use of Fisher's exact test or analysis of variance (ANOVA) is specified in brackets; NA—not applicable.

^bTen patients received deGrammonte regimen, six patients received Xeloda (capecitabine) and four patients received 5-FU and leucovorin (FUFA) combination.

^cTwelve patients also received Avastin in combination. Significant differences between groups in bold.

Table II. Differences in transcript levels of ABCs between tumour and control tissues

Gene	All patients, <i>n</i> = 51 ^a	Tumour versus control
ABCA1	0.001	Down-regulation
ABCA2	NS	No change
ABCA3	0.017	Down-regulation
ABCA4	0.001	Down-regulation
ABCA5	<0.001	Down-regulation
ABCA6	<0.001	Down-regulation
ABCA7	NS	No change
ABCA8	<0.001	Down-regulation
ABCA9	<0.001	Down-regulation
ABCA10	<0.001	Down-regulation
ABCA12	<0.001	Up-regulation
ABCA13	0.002	Up-regulation
ABCB1	<0.001	Down-regulation
ABCB2	NS	No change
ABCB3	NS	No change
ABCB4	<0.001	Down-regulation
ABCB5	<0.001	Down-regulation
ABCB6	0.004	Up-regulation
ABCB7	NS	No change
ABCB8	NS	No change
ABCB9	NS	No change
ABCB10	0.003	Down-regulation
ABCB11	<0.001	Down-regulation
ABCC1	<0.001	Up-regulation
ABCC2	0.001	Up-regulation
ABCC3	<0.001	Down-regulation
ABCC4	0.008	Down-regulation
ABCC5	<0.001	Down-regulation
ABCC6	<0.001	Down-regulation
ABCC7	0.001	Down-regulation
ABCC8	<0.001	Down-regulation
ABCC9	NS	No change
ABCC10	NS	No change
ABCC11	NS	No change
ABCC13	<0.001	Down-regulation
ABCD1	NS	No change
ABCD2	<0.001	Down-regulation
ABCD3	<0.001	Down-regulation
ABCD4	<0.001	Down-regulation
ABCE1	<0.001	Up-regulation
ABCF1	NS	No change
ABCF2	NS	No change
ABCF3	NS	No change
ABCG1	<0.001	Down-regulation
ABCG2	<0.001	Down-regulation
ABCG4	NS	No change
ABCG5	NS	No change
ABCG8	NS	No change

^aSignificantly deregulated genes by REST software (*P*-value displayed); NS—non significant.

Then, the ratio of C_T values for ABC gene/ENDO was calculated and used for non-parametric tests as described in Materials and methods. Thus, the higher ABC/ENDO ratios signify lower relative ABC transcript levels. Clinical characteristics presented in Table I were correlated with transcript levels of ABC genes in tumour tissues. A significant inverse correlation between ABCC10 and tumour grade was found; the higher the grade, i.e. the more aggressive the tumour, the lower the ABCC10 transcript level (Table III). Transcript levels of ABCA12, ABCC7 and ABCC8 in tumour tissues had the following significant trend in tumour localisation: colon < rectosigmoidesum < rectum. Interestingly, all three of the above listed transcripts followed exactly the same trend in control tissues as in tumours (Table III). However, ABCB9,

ABCB11, ABCG5 and ABCG8 followed the opposite significant trend, i.e. a decrease in transcript levels in the direction from colon to rectum (Table III).

Relations between transcript levels of ABCs in tumours and chemotherapy outcome

In the group of patients with metastatic CRC, the response to the palliative chemotherapy significantly correlated with the transcript levels of ABCC6, ABCC11, ABCF1 and ABCF2 (Table III). In the group of patients with radically R0 removed tumours, the DFI after adjuvant chemotherapy was influenced by transcript levels of several ABCs. Patients with a low transcript level of ABCA7 (cut-off ≥ 1.25) had a significantly shorter DFI ($P = 0.033$, log-rank test) and a higher HR of progression than patients with a high transcript level (HR = 5.09, 95% HR confidence limits = 0.97–6.7; Figure 1A). Similarly, patients with low transcript levels of ABCA13 (cut-off ≥ 1.58), ABCB4 (cut-off ≥ 1.48), ABCC11 (cut-off ≥ 1.68) and ABCD4 (cut-off ≥ 1.19) had a shorter DFI and a higher HR of progression ($P = 0.011$, HR = 5.75, 95% HR confidence limits = 1.25–26.37; $P = 0.003$, HR = 15.83, 95% HR confidence limits = 1.72–145.92; $P = 0.016$, HR = 8.81, 95% HR confidence limits = 1.05–74.16; $P = 0.023$, HR = 5.51, 95% HR confidence limits = 1.07–28.48, respectively, Figure 1B–E) than patients with high transcript levels. ABCC11 was thus a significant predictor of chemotherapy outcome in both groups of patients.

Discussion

The efflux of endogenous substrates and also xenobiotics including anticancer drugs out of the cells presents the principal activity of ABCs. Thus, ABCs could be important for both CRC onset and CRC treatment outcome. A number of monogenic disorders have been associated with ABCs, e.g. mutations in *ABCC7* gene with the onset of cystic fibrosis and thus, the analysis of mutations in ABCs is routinely used for genetic testing (9). Although some of the studies observed significant associations between polymorphisms in ABCs and the cancer risk, including CRC, there has been no validated marker among all known 49 human ABCs for CRC prognosis and therapy outcome prediction until now. Based on the results of our pilot study, we propose ABC10 and ABCC11 as such markers and targets for validation studies focused on their confirmation or rejection.

Despite numerous published studies in animals and cell models showing the functional impact of ABCs on multidrug resistance, no convincing evidence of a clinical utility of ABCs as markers for the prediction of chemotherapy outcome in cancer patients has been published to date. The majority of published studies deal with associations of SNPs with therapy outcome or toxicity. However, there is limited knowledge about the association between genotype and phenotype. The reason may be the complexity of ABCs, which are promiscuous and overlap in spectra of transported substrates. The lack of information about gene and protein expressions and activity of ABCs in homogenous groups of patients treated by the same spectra of drugs further complicates the evaluation of their importance. CRC seems to be a suitable disease for the pharmacogenomic profiling of ABCs because it is routinely treated by prototypical substrate of certain ABCs, 5-FU. Therefore, we have conducted a pilot study aimed at the evaluation of transcript profiles of all human ABCs in two

Table III. Significant correlations of transcript levels of ABCs with clinical data

Grade	G1 (<i>n</i> = 6) ^a	G2 (<i>n</i> = 38) ^a	G3 (<i>n</i> = 7) ^a	<i>P</i> ^b
ABCC10	1.14 ± 0.04	1.17 ± 0.04	1.23 ± 0.05	0.010
Primary localisation—tumour tissue	Colon (<i>n</i> = 24) ^a	Rectosigmoideum (<i>n</i> = 12) ^a	Rectum (<i>n</i> = 14) ^a	<i>P</i> ^b
ABCA12	1.65 ± 0.22	1.50 ± 0.10	1.46 ± 0.17	0.020
ABCC7	1.14 ± 0.18	1.07 ± 0.10	1.02 ± 0.04	0.017
ABCC8	1.78 ± 0.15	1.77 ± 0.14	1.67 ± 0.15	0.042
Primary localisation—control tissue				
ABCA12	1.76 ± 0.14	1.64 ± 0.10	1.59 ± 0.10	0.001
ABCC7	1.04 ± 0.08	1.01 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.005
ABCC8	1.52 ± 0.08	1.50 ± 0.05	1.44 ± 0.04	0.002
ABCB9	1.25 ± 0.03	1.27 ± 0.04	1.29 ± 0.03	0.005
ABCB11	1.29 ± 0.11	1.32 ± 0.05	1.37 ± 0.05	0.004
ABCG5	1.52 ± 0.10	1.62 ± 0.07	1.65 ± 0.09	<0.001
ABCG8	1.47 ± 0.11	1.58 ± 0.10	1.60 ± 0.10	<0.001
Response in palliative group	Responders (<i>n</i> = 13) ^a	Non-responders (<i>n</i> = 13) ^a	<i>P</i> ^b	
ABCC6	1.23 ± 0.05	1.28 ± 0.06	0.033	
ABCC11	1.57 ± 0.06	1.69 ± 0.06	<0.001	
ABCF1	1.06 ± 0.03	1.08 ± 0.03	0.044	
ABCF2	1.09 ± 0.03	1.12 ± 0.03	0.015	

^aMean ± SD.^bSignificant differences analysed by independent Kruskal–Wallis test.

groups of CRC patients strongly differing in prognosis. Patients who underwent the radical surgical resection of the tumour have better prognosis than patients with the metastatic disease. Both groups were treated by chemotherapy regimens based on 5-FU and the short-term evaluation of response to this treatment was available. We hypothesised that a strong effect of potential marker(s) should be clearly visible in both groups. As far as we are aware, this is the first complex study of the role of ABC transporters in the tumour development and treatment conducted on CRC patients.

The majority of the studied ABCs were down-regulated or unchanged between tumours and non-neoplastic control tissues in this study. ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCC1, ABCC2 and ABCE1 were up-regulated in tumours versus control tissues. There are several studies on the assessment of transcript or protein levels of the selected ABCs (usually ABCB1, ABCG2 and members of ABCC subfamily) in the literature of CRC. Our data comply with the previous reports with regard to the down-regulation of ABCB1 (20) and ABCC3 as well as the up-regulation of ABCC2 in colorectal tumours (29). In addition, we found the up-regulation of ABCC1 that had not been previously detected (29). Moreover, our results confirmed the previously observed down-regulation of ABCG2. ABCG2 mRNA showed a 6-fold decrease in colorectal tumours in comparison with control tissues (48). A ubiquitous expression of ABCE1 mRNA in normal and tumour colon tissues was found. Among 21 peptides with the HLA-A2-binding motifs, two ABCE1-derived peptides were recognised by the colon cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in a dose-dependent manner. The authors suggested that ABCE1 and its peptides could be target molecules in specific immunotherapy for HLA-A2-positive CRC patients (49). Our observation of significant up-regulation of ABCE1 in tumour tissue of CRC patients, if confirmed by independent study, may be relevant for targeted therapy of CRC. There are no literature data on transcript or protein levels of other ABCs in tumour and non-neoplastic tissues from a series of CRC patients.

The analysis of the tumour localisation has identified highly interesting trends. Transcript levels of certain ABCs increased or declined in direction from colon to rectum in a significant trend. Firstly, we noticed this effect in the tumour tissues. To discern this effect from possible deregulation of mRNA expression by the tumour pathophysiology, we analysed the tissue distribution of transcripts of ABCs also in non-neoplastic control tissues. The same ABCs as in tumours, namely ABCA12, ABCC7 and ABCC8, were found differentially distributed in control tissues maintaining the same trend towards localisation (increase from colon to rectum). Additionally, ABCB9, ABCB11, ABCG5 and ABCG8 followed the opposite significant trend, i.e. a decrease in transcript levels in direction from colon to rectum. Significant changes in gene and protein expression along the anterior–posterior intestinal axis were observed for solute carrier transporters in mice (50). Moreover, mRNA expression levels of murine *Abcb2*, *Abcb3*, *Abcb9*, *Abcc3*, *Abcc6*, *Abcd1*, *Abcg5* and *Abcg8* displayed significantly differential gene expression along the duodenum, jejunum, ileum and colon (51). In human samples, the expression of mRNA for ABCB1 and ABCC2 was highest in jejunum and decreased towards more distal regions, whereas ABCC1 was equally distributed in all intestinal regions (52). We did not confirm the results of Gutmann *et al.* (53) who found that mRNA expression of ABCG2 was maximal in the duodenum and decreased continuously down to the rectum, perhaps due to the fact that we had no access to samples from duodenum. Moreover, human ABCs identified by us to be differentially distributed in colorectal tissues have not been studied in this regard yet. A possible relevance of the observed gradient in expression of ABCs for efficacy of CRC chemotherapy shall be further studied.

The majority of clinically associated ABCs were either down-regulated or unchanged in tumours versus control tissues. In terms of chemotherapy outcome, the induction of mRNA levels of ABCs and subsequent enhancement of their effect cannot be ruled out. In fact, the ABCG2 mRNA content in hepatic metastases was found to be higher after an

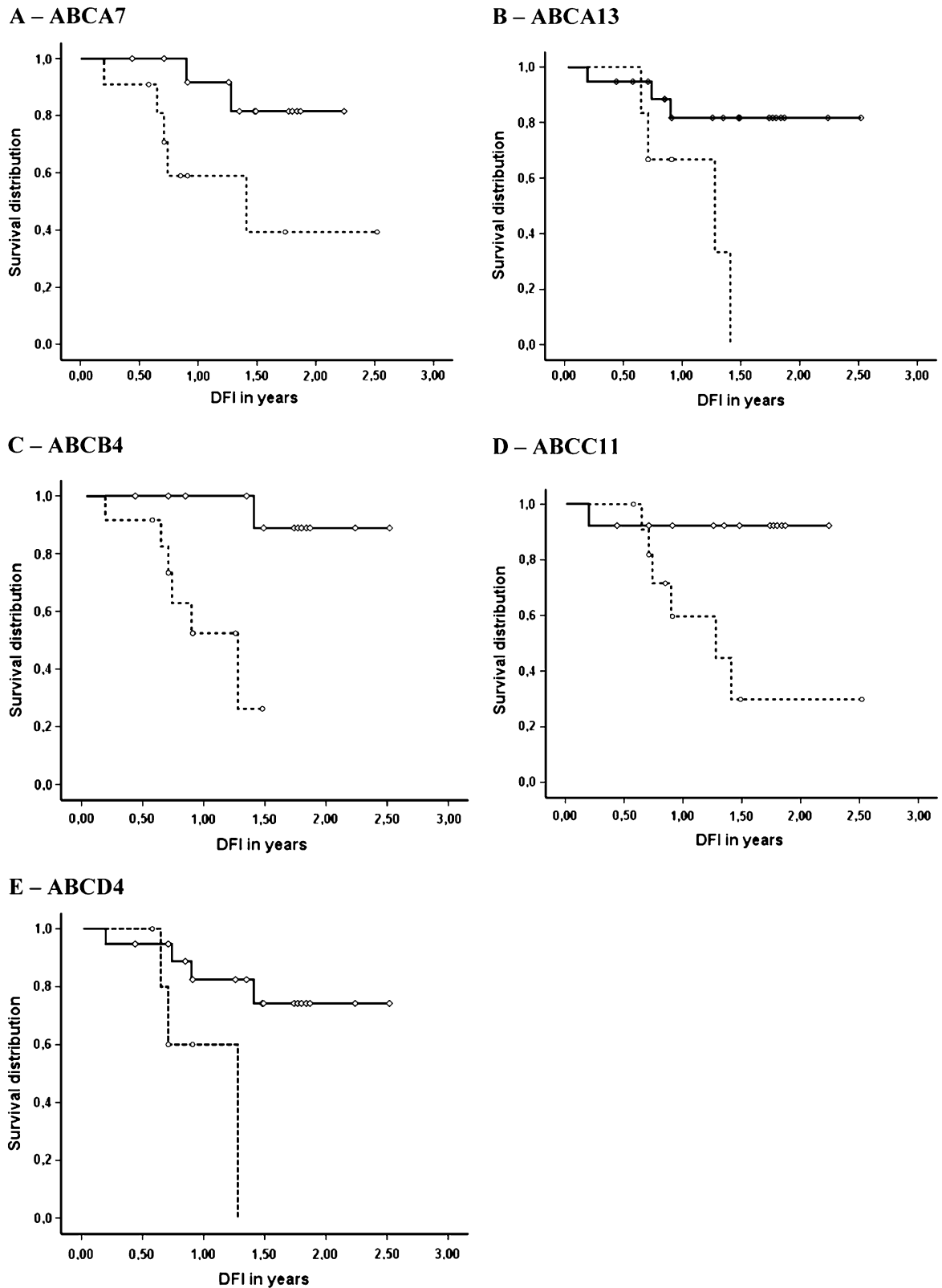


Fig. 1. Kaplan–Meier survival plots presenting the relation between DFI and transcript levels of ABCs. Survival curves are shown for two groups of patients divided by cut-off (for evaluation of cut-off, see Materials and methods). Individual figures illustrate Kaplan–Meier survival plots of patients with respect to transcript levels of ABCA7 (**A**, cut-off 1.25), ABCA13 (**B**, 1.58), ABCB4 (**C**, 1.48), ABCC11 (**D**, 1.68) and ABCD4 (**E**, 1.19). Dashed lines represent the group with higher normalised values than cut-off (meaning low transcript levels of ABCs) and solid lines represent the group with lower or equal values than cut-off (high transcript levels of ABCs).

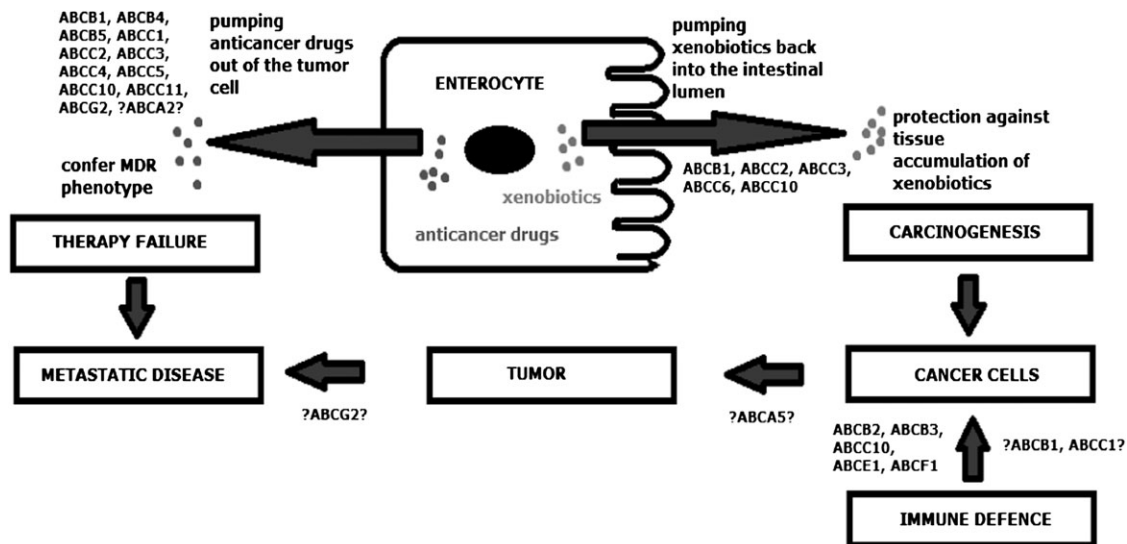


Fig. 2. Proposed involvement of ABCs in CRC development, progression and treatment outcome.

irinotecan-based chemotherapy than in irinotecan-naïve metastases (54). However, the access to post-operative liver metastases in the studied group of patients was limited and such analysis will be the subject of the validation study. In this context, it seems quite interesting that, according to recent study, synchronous or metachronous liver metastases could be treated differently on the basis of different gene expression signatures (55).

The transcript level of ABCC10 in tumours correlated with the grade in our study. There are no data on ABCC10 role in CRC in the literature. The lower ABCB1 expression was found in poorly differentiated CRC tumours ($P < 0.05$; 20) in line with the study on cell lines, where ABCB1 had a higher expression in well-differentiated colon cancer cells, when compared with the poorly differentiated ones (14). An increasing expression of another member of ABCC subfamily, ABCC3 with higher grade, i.e. the opposite trend to our observation with ABCC10, was found in pancreatic tumours (56). No further data on the association of other ABCs with grading in CRC are currently available. Zhang *et al.* (57) indicated that ABCB1 expression significantly correlated with tumour localisation ($P = 0.039$) and gender ($P = 0.043$). The intensity of immunohistochemical ABCG2 protein staining was higher in tumours of CRC patients with lymph node positive than in negative disease (30 versus 6.7%, respectively; $P < 0.025$). Thus, it seemed that ABCG2 expression may be important for progression and metastasis of CRC (58). Our pilot study, however, did not confirm any of the above published associations.

In the group of patients treated by palliative chemotherapy, the response was analysed using RECIST criteria. Patients were divided into two groups (responders versus non-responders). Transcript levels of ABCC6, ABCC11, ABCF1 and ABCF2 were significantly higher in responders in comparison with non-responders. In the group of patients treated by the adjuvant chemotherapy after the radical surgical resection of tumour, the relation between transcript levels of ABCs and DFI was evaluated. DFI was significantly shorter and HR of progression higher in patients with low transcript levels of ABCA7, ABCA13, ABCB4, ABCC11 and ABCD4, suggesting that these genes play a role in the therapy outcome

of patients treated by the adjuvant chemotherapy. Thus, ABCC11 was up-regulated in the chemotherapy-naïve tumours from patients who subsequently achieved a good response to the chemotherapy in both palliative and adjuvant groups. ABCC11 was shown to be a resistance factor for fluoropyrimidines (34). Oguri *et al.* (59) discovered that expression of the ABCC11 is induced by 5-FU and that ABCC11 is directly involved in 5-FU resistance by the efflux transport of the active metabolite FdUMP in human small-cell lung cancer cell lines. We hypothesise that the high ABCC11 expression in tumours before chemotherapy observed in both groups of CRC patients studied by us may limit further induction of ABCC11 by 5-FU treatment. However, to confirm or reject our idea, we need to analyse post-chemotherapy samples from the same patients or run a larger validation study.

It is also interesting that the most studied ABCs in the area of chemoresistance, ABCB1, ABCC1-5 and ABCG2 did not predict 5-FU therapy outcome in our CRC patients. We cannot add more evidence to the results of the recent study reporting that ABCC11 in CRC tissues could predict the reduced folate level after leucovorin administration and determine the efficacy of treatment by leucovorin (60). Schmidt *et al.* (61) observed up-regulation of ABCC6 in 5-FU-resistant colon tumour cell lines. Quite recently, ABCC3, ABCC4 and ABCC5 were found up-regulated in 5-FU-resistant pancreatic carcinoma cells (62). Nevertheless, results obtained using rather uniform cell line models cultured in the presence of a drug for a long time may not reflect the real situation in such a heterogeneous entity as colorectal tumour or a series of such tumours. As regards, observation in cancer patients, a significant down-regulation of gene expression in a number of ABCs was found in breast cancer patients ($n = 19$) receiving preoperative (neoadjuvant) chemotherapy regimens including 5-FU. ABCA1, ABCA12, ABCB6, ABCC5, ABCC11 and ABCC13 were down-regulated in patients with complete pathological response, in comparison with patients with residual disease. In contrast, ABCB2, ABCC7 and ABCF2 were up-regulated in patients with complete pathological response (63). In breast cancer patients treated with endocrine therapy, ABCF2 protein immunopositive tumours had a longer disease-free survival when the tumours were oestrogen receptor negative or

progesterone receptor negative ($P = 0.002$ and 0.005 , respectively; 64). Thus, the up-regulation of ABCF2 observed by us in CRC patients corresponds to available data on breast and cervical cancers. It seems obvious that ABCs have tumour-specific expression profiles (65) and thus also different roles in the mechanism of chemoresistance of the cancer cell (summarised in Figure 2). Thus, further studies are needed to evaluate the importance of the results obtained by this study.

The study of transcript levels rather than protein expression may be seen as the major limitation of our study. The power of protein analysis is obvious. However, the use of immunohistochemical analysis is semi-quantitative and reflects only protein level and not its activity. In addition, the issue of availability, specificity and selectivity of the antibodies further limits protein analysis. The correlations between transcript and protein levels of human ABCs are mostly unknown and thus, we shall consider transcript levels as independent markers. For the assessment of transcript levels, we have used highly sensitive methods based on real-time PCR, which is superior to relative or semi-quantitative approaches. The small sample size and absence of correction for multiple testing could be seen as another limitation of our pilot study. Thus, all results should be interpreted with caution and need to be confirmed by both retrospective and prospective validation studies on a larger and independent series of CRC patients.

In conclusion, our pilot study brings to light new and interesting data. Transcript levels of all known human ABC transporter genes were assessed in a series of tumour and control tissue samples from well-characterised CRC patients. Several genes were found deregulated in tumours compared with control tissues and a gradient of transcript levels along the superior–inferior axis of the large intestine was observed for the first time. The comparison of outcomes of patients treated by the 5-FU-based regimens suggested that ABCC11 may present a promising candidate marker. The validation of candidate genetic markers identified in the pilot study will be the next goal of our current research.

Supplementary data

Supplementary Table IS–VIS and Material are available at *Mutagenesis* Online.

Funding

Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (NR 10230-3 to V.L. and P.S.); Czech Science Foundation (310/07/1430 to P.S. and P.V.) and Grant Agency of Charles University (GAUK 15109/2009 to I.H.).

Acknowledgements

Authors wish to thank Dr Stanislav Kormunda for survival analysis.

Conflict of interest statement: None declared.

References

- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. D. and Parkin, D. (2010) *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10*. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr> (accessed September 8, 2010).
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. and Hemminki, K. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 78–85.
- Aaltonen, L., Johns, L., Jarvinen, H., Mecklin, J. P. and Houlston, R. (2007) Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 356–361.
- Watson, A. J. and Collins, P. D. (2011) Colon cancer: a civilization disorder. *Dig. Dis.*, **29**, 222–228.
- Soucek, P. (2008) Xenobiotics. In Schwab, M. (ed.), *Encyclopedia of Cancer*. 2nd edn. Springer-Verlag, New York, NY.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H. *et al.* (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, **258**, 1650–1654.
- Mendoza, J. L., Urcelay, E., Lana, R. *et al.* (2007) MDR1 polymorphisms and response to azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, **13**, 585–590.
- Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 67–113.
- Kaminski, W. E., Piehler, A. and Wenzel, J. J. (2006) ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 510–524.
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J. *et al.* (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, **346**, 362–365.
- Gottesman, M. M., Fojo, T. and Bates, S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 48–58.
- Ejendal, K. F. and Hrycyna, C. A. (2002) Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **3**, 503–511.
- Broccardo, C., Luciani, M. and Chimini, G. (1999) The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim. Biophys. Acta*, **1461**, 395–404.
- Ohtsuki, S., Kamoi, M., Watanabe, Y., Suzuki, H., Hori, S. and Terasaki, T. (2007) Correlation of induction of ATP binding cassette transporter A5 (ABCA5) and ABCB1 mRNAs with differentiation state of human colon tumor. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1144–1146.
- Choudhuri, S. and Klaassen, C. D. (2006) Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.*, **25**, 231–259.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O. *et al.* (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **97**, 3473–3478.
- Sharom, F. J. (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, **9**, 105–127.
- Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T. and Kim, R. B. (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75**, 13–33.
- Vaclavikova, R., Nordgard, S. H., Alnaes, G. I. *et al.* (2008) Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet. Genomics*, **18**, 263–273.
- De Iudicibus, S., De Pellegrin, A., Stocco, G., Bartoli, F., Bussani, R. and Decorti, G. (2008) ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Res.*, **28**, 3921–3928.
- Ding, Z., Yang, L., Xie, X., Xie, F., Pan, F., Li, J., He, J. and Liang, H. (2010) Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **136**, 1697–1707.
- Johnsson, A., Vallon-Christensson, J., Strand, C., Litman, T. and Eriksen, J. (2005) Gene expression profiling in chemoresistant variants of three cell lines of different origin. *Anticancer Res.*, **25**, 2661–2668.
- Kasajima, A., Sers, C., Sasano, H. *et al.* (2010) Down-regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer. *Hum. Pathol.*, **41**, 1758–1769.
- Zhou, S. F., Wang, L. L., Di, Y. M., Xue, C. C., Duan, W., Li, C. G. and Li, Y. (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr. Med. Chem.*, **15**, 1981–2039.
- Leslie, E. M., Haimeur, A. and Waalkes, M. P. (2004) Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.*, **279**, 32700–32708.
- Smitherman, P. K., Townsend, A. J., Kute, T. E. and Morrow, C. S. (2004) Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent

detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**, 260–267.

27. Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R. G. and Cole, S. P. (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.*, **5**, 21–53.
28. Fujita, K., Nagashima, F., Yamamoto, W. *et al.* (2008) Association of ATP-binding cassette, sub-family C, number 2 (ABCC2) genotype with pharmacokinetics of irinotecan in Japanese patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFIRI). *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2137–2142.
29. Hinoshita, E., Uchiyama, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K. and Kuwano, M. (2000) Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2401–2407.
30. Theile, D., Grebhardt, S., Haefeli, W. E. and Weiss, J. (2009) Involvement of drug transporters in the synergistic action of FOLFOX combination chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 1366–1373.
31. Pratt, S., Shepard, R. L., Kandasamy, R. A., Johnston, P. A., Perry, W., III and Dantzig, A. H. (2005) The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol. Cancer Ther.*, **4**, 855–863.
32. Gradilone, A., Pulcinelli, F. M., Lotti, L. V. *et al.* (2008) Celecoxib upregulates multidrug resistance proteins in colon cancer: lack of synergy with standard chemotherapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **8**, 414–420.
33. Gazzaniga, P., Gradilone, A., Petracca, A., Nicolazzo, C., Raimondi, C., Iacovelli, R., Naso, G. and Cortesi, E. (2010) Molecular markers in circulating tumour cells from metastatic colorectal cancer patients. *J. Cell. Mol. Med.*, **14**, 2073–2077.
34. Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z. S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G. and Kruh, G. D. (2003) MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29509–29514.
35. Shani, N. and Valle, D. (1996) A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **93**, 11901–11906.
36. Campa, D., Pardini, B., Naccarati, A. *et al.* (2008) A gene-wide investigation on polymorphisms in the ABCG2/BRCP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Mutat. Res.*, **645**, 56–60.
37. Dietrich, C. G., Vehr, A. K., Martin, I. V., Gaßler, N., Rath, T., Roeb, E., Schmitt, J., Trautwein, C. and Geier, A. (2011) Downregulation of breast cancer resistance protein in colon adenomas reduces cellular xenobiotic resistance and leads to accumulation of a food-derived carcinogen. *Int. J. Cancer*, **129**, 546–552.
38. Nakatomi, I., Yoshikawa, M., Oka, M. *et al.* (2001) Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 827–832.
39. Chikazawa, N., Tanaka, H., Tasaka, T., Nakamura, M., Tanaka, M., Onishi, H. and Katano, M. (2010) Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells. *Anticancer Res.*, **30**, 2041–2048.
40. Hostettler, L., Zlobec, I., Terracciano, L. and Lugli, A. (2010) ABCG5-positivity in tumor buds is an indicator of poor prognosis in node-negative colorectal cancer patients. *World J. Gastroenterol.*, **16**, 732–739.
41. Sobin, L. H. and Wittekind, C. (eds) (2002) *TNM Classification of Malignant Tumors*. 6th edn. Wiley-Liss, New York, NY.
42. Therasse, P., Arbuck, S. G., Eisenhauer, E. A. *et al.* (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl Cancer Inst.*, **92**, 205–216.
43. Soucek, P., Anzenbacher, P., Skoumalova, I. and Dvorak, M. (2005) Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, **23**, 1417–1422.
44. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paep, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, **3**, research0034.1–research0034.11.
45. Andersen, C. L., Jensen, J. L. and Ørntoft, T. F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, **64**, 5245–5250.
46. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A. *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
47. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. *Nucleic Acids Res.*, **30**, e36.
48. Gupta, N., Martin, P. M., Miyauchi, S., Ananth, S., Herdman, A. V., Martindale, R. G., Podolsky, R. and Ganapathy, V. (2006) Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 571–577.
49. Shichijo, S., Ishihara, Y., Azuma, K. *et al.* (2005) ABCE1, a member of ATP-binding cassette transporter gene, encodes peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in colon cancer patients. *Oncol. Rep.*, **13**, 907–913.
50. Anderle, P., Sengstag, T., Mutch, D. M., Rumbo, M., Praz, V., Mansourian, R., Delorenzi, M., Williamson, G. and Roberts, M. A. (2005) Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior-posterior and crypt-villus axes. *BMC Genomics*, **6**, 69.
51. Mutch, D. M., Anderle, P., Fiaux, M., Mansourian, R., Vidal, K., Wahli, W., Williamson, G. and Roberts, M. A. (2004) Regional variations in ABC transporter expression along the mouse intestinal tract. *Physiol. Genomics*, **17**, 11–20.
52. Berggren, S., Gall, C., Wollnitz, N., Ekelund, M., Karlbom, U., Hoogstraate, J., Schrenk, D. and Lennernäs, H. (2007) Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Mol. Pharm.*, **4**, 252–257.
53. Gutmann, H., Hruz, P., Zimmermann, C., Beglinger, C. and Drewe, J. (2005) Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 695–699.
54. Candeil, L., Gourdiere, I., Peyron, D. *et al.* (2004) ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int. J. Cancer*, **109**, 848–854.
55. Pantaleo, M. A., Astolfi, A., Nannini, M. *et al.* (2008) Gene expression profiling of liver metastases from colorectal cancer as potential basis for treatment choice. *Br. J. Cancer*, **99**, 1729–1734.
56. König, J., Hartel, M., Nies, A. T., Martignoni, M. E., Guo, J., Büchler, M. W., Friess, H. and Keppler, D. (2005) Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, **115**, 359–367.
57. Zhang, Z., Deng, X., Ren, X., Zhang, B., Chen, X., Yang, J., Ding, H., Sui, J. and Song, X. (2010) Expression of mutant p53 and of the multidrug resistant proteins P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi correlated in colorectal adenocarcinoma. *Scand. J. Gastroenterol.*, **45**, 925–934.
58. Liu, H. G., Pan, Y. F., You, J., Wang, O. C., Huang, K. T. and Zhang, X. H. (2010) Expression of ABCG2 and its significance in colorectal cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **11**, 845–848.
59. Oguri, T., Bessho, Y., Achiwa, H., Ozasa, H., Maeno, K., Maeda, H., Sato, S. and Ueda, R. (2007) MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 122–127.
60. Sadahiro, S., Suzuki, T., Maeda, Y. *et al.* (2010) Molecular determinants of folate levels after leucovorin administration in colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **65**, 735–742.
61. Schmidt, W. M., Kalipcian, M., Dornstauder, E., Rizovski, B., Steger, G. G., Sedivy, R., Mueller, M. W. and Mader, R. M. (2004) Dissecting progressive stages of 5-fluorouracil resistance in vitro using RNA expression profiling. *Int. J. Cancer*, **112**, 200–212.
62. Hagmann, W., Jesnowski, R., Faissner, R., Guo, C. and Löhr, J. M. (2009) ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatol.*, **9**, 136–144.
63. Park, S., Shimizu, C., Shimoyama, T. *et al.* (2006) Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, **99**, 9–17.
64. Ogawa, Y., Tsuda, H., Hai, E. *et al.* (2006) Clinical role of ABCF2 expression in breast cancer. *Anticancer Res.*, **26**, 1809–1814.
65. Zhang, W., Shannon, W. D., Duncan, J., Scheffer, G. L., Schep, R. J. and McLeod, H. L. (2006) Expression of drug pathway proteins is independent of tumour type. *J. Pathol.*, **209**, 213–219.

Příloha č. 9

Mohelnikova-Duchonova B.

Pancreatic Cancer: What is the Role of ABC Transporters?

Pancreatic Dis Ther. **2011**; 1:e101. doi:10.4172/pdt.1000e101

Pancreatic Cancer: What is the Role of ABC Transporters?

Beatrice Mohelnikova-Duchonova^{1,2*}

¹Department of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

²Department of Oncology, Palacky University Medical School and Teaching Hospital in Olomouc, Czech Republic

Pancreatic carcinoma is one of the most severe forms of malignant disease with high mortality [1]. The etiology and molecular pathogenesis of the disease is still weakly understood [2]. The prognosis of patients remains very poor. Operative resection is the only therapeutic option with curative potential, but no more than 20% of patients have potentially operable tumors, and many of them experience recurrence of the disease despite the radical surgery [3]. Patients who received chemotherapy showed better survival than those who received only the best supportive care [4]. Despite this fact, resistance developed against anticancer drugs significantly limits their clinical use and influences the overall survival. Inter-individual differences in anticancer drugs pharmacokinetics and pharmacodynamics have been demonstrated. One of the most important mechanisms of the drug resistance is low accumulation of the drug in cancer cells caused by decreased uptake or increased efflux of the drug. The efflux is performed mainly by transmembrane ABC transporters [5]. The human family of ABC transporters has 49 members divided into 7 subfamilies (named ABCA - ABCG based on sequence similarities, [6]). Fourteen ABC transporters have been shown to contribute to the drug resistance in cancer cells, causing so called "multi drug resistance" (MDR) phenotype in cell lines and/or patients with various types of cancers (namely ABCA2, ABCB1/MDR1, ABCB4, ABCB11, ABCC1-ABCC6, ABCC10-ABCC12 and ABCG2/BCRP) [7].

Besides the well-known function of ABC transporters in the multidrug resistance to anticancer therapy there are important physiological functions of these proteins. It is clear that ABC transporters play an important role in all aspects of malignant disease: individual cancer susceptibility, tumor initiation and progression as well as the response of immunity system to tumor cells and the sensitivity of tumor cells to chemotherapy. The efflux of endogenous substrates and xenobiotics (including anticancer drugs) out of the cells presents the principal detoxification activity of ABCs.

Mutant K-ras activation and/or hypoxia of human pancreatic ductal epithelial (HPDE) cells led to induction of various ABC transporters [8]. Thus, ABCs could be important for both the pancreatic cancer onset and for the treatment outcome as well. König et al. [9] quantified the mRNA expression of nine ABCC family members and of ABCG2 in normal human pancreas and in pancreatic carcinoma (n=37). The expression of ABCC3 and ABCC5 mRNA was upregulated in pancreatic carcinoma samples. The authors suggested that ABCC3 and ABCC5 are involved in drug resistance of pancreatic tumors and analysis of their expression may contribute to the prediction of the chemotherapy outcome. ABCC5 mRNA expression in pancreatic adenocarcinoma cell lines significantly correlated with cellular sensitivity to 5-fluorouracil (5-FU) [10]. This result suggests that ABCC5 is expressed and functionally active and contributes to variable sensitivities of pancreatic adenocarcinoma cell lines to 5-FU. Further investigations using models that resemble human pancreatic tumors are necessary to prove a causative relation between expression and activity of ABCC5 and tumor resistance to 5-FU. *In vitro*, overexpression of the ABCB4 has been directly implicated in resistance to a spectrum of chemotherapeutic agents such as paclitaxel and doxorubicin [11,12]. ABCC10 mRNA levels

were remarkably increased in doxorubicin-treated (MCF7) cells and its expression seems to be regulated in a TP53-dependent manner [13]. However, the nucleotides were not found to be transported by ABCC10 and nucleotide analogs are the most common pancreatic cancer therapeutics.

In conclusion, contributions of ABCs to chemoresistance of pancreatic cancer remain unknown. Similarly, their specific functions in other aspects of malignant disease, e.g. individual cancer susceptibility, tumor initiation, progression and the response of immunity system to tumor cells are not well understood. Based on the results of different studies, it is clear that some members of ABC transporters superfamily (e.g. ABCC1, ABCC3, ABCC5, and ABCC10) are possible genetic markers and targets for further validation studies on pancreatic carcinoma chemoresistance. A better understanding of genetic and molecular features of processes mediated by ABCs shall greatly improve pancreatic cancer treatment modalities. It remains an interesting field for future research to identify subgroups of patients who may benefit from specific anticancer drugs and "tailor" therapy to their "tumor profile".

References

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, et al. (2009) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 59: 225-249.
2. Mohelnikova-Duchonova B, Marsakova L, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, et al. (2011) Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas* 40: 72-78.
3. Sharma C, Eitawil KM, Renfrew PD, Walsh MJ, Molinari M (2011) Advances in diagnosis, treatment and palliation of pancreatic carcinoma: 1990-2010. *World J Gastroenterol* 17: 867-897.
4. Park JK, Yoon YB, Kim YT, Ryu JK, Yoon WJ, et al. (2008) Survival and prognostic factors of unresectable pancreatic cancer. *J Clin Gastroenterol* 42: 86-91.
5. Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P, (2011) The Role of Membrane Transporters in Cellular Resistance of Pancreatic Carcinoma to Gemcitabine and Erlotinib. *Horizons in Cancer Research* Volume 46.
6. <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>
7. Stavrovskaya AA, Stromskaya TP (2008) Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* 73: 592-604.
8. Lo M, Tsao MS, Hedley D, Ling V (2009) Gene expression profiling of adenosine triphosphate-binding cassette transporters in response to K-ras

*Corresponding author: Beatrice Mohelnikova-Duchonova, Department of Oncology, Palacky University, Czech Republic; E-mail: beatrice.mohelnikova@gmail.com

Received December 07, 2011; Accepted December 12, 2011; Published December 14, 2011

Citation: Mohelnikova-Duchonova B (2011) Pancreatic Cancer: What is the Role of ABC Transporters? *Pancreatic Dis Ther* 1:e101. doi:10.4172/pdt.1000e101

Copyright: © 2011 Mohelnikova-Duchonova B. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

- activation and hypoxia in human pancreatic cancer cell cultures. *Pancreas* 38: 85-93.
9. König J, Hartel M, Nies AT, Martignoni ME, Guo J, et al. (2005) Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer* 115: 359-367.
 10. Nambaru PK, Hübner T, Köck K, Mews S, Grube M, et al. (2011) Drug efflux transporter multidrug resistance-associated protein 5 affects sensitivity of pancreatic cancer cell lines to the nucleoside anticancer drug 5-fluorouracil. *Drug Metab Dispos.* 39: 132-139.
 11. Duan Z, Brakora KA, Seiden MV (2004) Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3: 833-838.
 12. Turton NJ, Judah DJ, Riley J, Davies R, Lipson D, et al. (2001) Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance. *Oncogene* 20: 1300-1306.
 13. Takayanagi S, Kataoka T, Ohara O, Oishi M, Kuo MT, et al. (2004) Human ATP-binding cassette transporter ABCC10: expression profile and p53-dependent upregulation. *J Exp Ther Oncol* 4: 239-246.

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

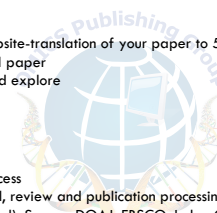
Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 200 Open Access Journals
- 15,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsgroup.info/editorialtracking/pancreatic-disorders>



Příloha č. 10

Mohelníková-Duchonová B, Soucek P.

Role membránových transportérů v chemorezistenci karcinomu pankreatu při terapii gemcitabinem.

Klin Onkol. 2010;23(5):306-10.

Role membránových transportérů v chemorezistenci karcinomu pankreatu při terapii gemcitabinem

The Role of Membrane Transporters in Cellular Resistance of Pancreatic Carcinoma to Gemcitabine

Mohelníková-Duchoňová B.^{1,2}, Souček P.¹

¹Laboratoře toxikogenomiky, Státní zdravotní ústav, Praha

²I. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Souhrn

Východiska: Karcinom pankreatu je jednou z nejzávažnějších forem nádorového onemocnění s velmi vysokou mortalitou, která ho v ČR řadí na čtvrtou příčku v příčinách úmrtí na nádorová onemocnění. Cytostatikum ze skupiny nukleosidových analog – gemcitabin – patří v současné době mezi široce užívané preparáty v onkologické léčbě a zejména u karcinomu pankreatu. Existují však významné interindividuální rozdíly ve farmakokinetice a farmakodynamice gemcitabinu, které mohou významně ovlivnit výsledek terapie u takto léčených pacientů. Vznik lékové rezistence výrazně limituje klinické využití gemcitabinu, stejně jako ostatních cytostatik. **Cíl:** V tomto článku jsou shrnuty základní dostupné informace o významných membránových proteinech účastnících se transportu gemcitabinu přes buněčnou membránu a jejich role při vzniku chemorezistence u nádorových buněk pankreatu.

Klíčová slova

karcinom pankreatu – membránové transportní proteiny – ABC přenašeče – proteiny přenášející nukleosidy – gemcitabin

Summary

Backgrounds: Pancreatic carcinoma is one of the most serious forms of cancer, with a very high mortality rate, and is the fourth leading cause of cancer-related death in the Czech Republic. The etiology and molecular pathogenesis of the disease is still poorly understood. Gemcitabine is a cytotoxic nucleoside analog, which is widely used in the treatment of malignancies, and in particular in pancreatic carcinoma. Interindividual differences in gemcitabine pharmacokinetics and pharmacodynamics have been demonstrated, which can significantly influence the outcome of the therapy in thus treated patients. Resistance developed to nucleoside analogs limits their clinical use, just like in the case of any other cytostatics. **Aim:** This review summarizes available data concerning the membrane proteins involved in the transport mechanism of gemcitabine through cellular membrane, and their role in the cellular resistance of pancreatic carcinoma to gemcitabine.

Key words

pancreatic cancer – membrane transport proteins – ATP-binding cassette transporters – nucleoside transport proteins – gemcitabine

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Beatrice
Mohelníková-Duchoňová
Laboratoře toxikogenomiky
Státní zdravotní ústav v Praze
Šrobárova 48
100 42 Praha 10
e-mail: mohelnikova@szu.cz

Obdrženo/Submitted: 22. 3. 2010

Přijato/Accepted: 10. 6. 2010

Úvod

Karcinom pankreatu (MKN-10 : C.25; OMIM : 260350) je jednou z nejzávažnějších forem nádorového onemocnění s velmi vysokou mortalitou, která ho v ČR řadí na čtvrtou příčku v příčinách úmrtí na nádorová onemocnění (zdroj ÚZIS 2010, www.novis.cz). Etiologie a molekulární patogeneze tohoto onemocnění nejsou stále objasněny. Mezi publikované rizikové faktory patří věk, pohlaví, diabetes, chronická pankreatitida, dietní návyky, kouření a infekce *Helicobacter pylori* [1,2]. Navíc genetická variabilita genů kódujících enzymy metabolismu cizorodných látek může rovněž hrát důležitou roli při vzniku a rozvoji této malignity.

Mezi základní prognostické faktory patří stadium onemocnění (staging), provedení radikálního chirurgického výkonu a výkonnostní stav pacienta (performance status) [3].

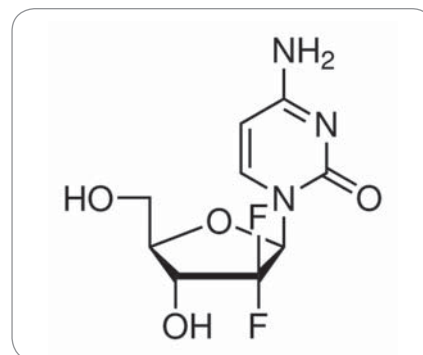
Molekulárně biologické prognostické faktory jsou intenzivně studovány, ale zatím bez uplatnění v klinické praxi [4].

Mutace v genu *KRAS* jsou přítomny přibližně v 85 % sporadických nádorů pankreatu [4]. Frekvence výskytu *KRAS* mutací jsou asociovány s kouřením, alkoholem a expozicí organickým rozpouštědly [5,6]. Tyto mutace lze detekovat již na samém počátku nádorového procesu [7]. Mutace v kodonu 12 působí změnu funkce *KRAS* proteinu, který setrvává v aktivovaném stavu, a umožňuje tak funkci signálních drah (MAPK, PI3K, NF- κ B a RAL-GTP), což vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a následné kumulaci pozdějších alterací v dalších genech, jako *CDKN2A*, *TP53* apod. [8]. Studie s využitím inhibice exprese pomocí siRNA poukázaly na zásadní úlohu *KRAS* při udržení nádorové populace [9,10]. *KRAS*-negativní tumory vykazují, co se týče přežívání pacientů po radioterapii, lepší výsledky než tumory s přítomnými mutacemi. Analýzou podtypů *KRAS* mutací u karcinomu pankreatu bylo v souladu s výše zmíněnou studií prokázáno, že na výsledné přežívání nemocných mají vliv zejména mutace cGT, GcT a GaT v kodonu 12 (wild type GGT) [11]. Tumory s mutacemi v kodonu 13 mají menší tendenci k lokální progresi i ke vzdálenému metastazování [12].

Prognóza tohoto onemocnění je vzhledem k mortalitě rovnající se incidenci infaustní. Chemoterapií pokročilého karcinomu pankreatu je dosahováno mediánu přežití jen kolem 5–8 měsíců. V kontrolních skupinách bez chemoterapie se pohybuje medián přežití pouze mezi 2 a 4 měsíci [3]. Jednou z příčin pozdní diagnostiky tohoto typu onemocnění. Klinické příznaky se objevují až v pozdních stádiích a v době diagnózy je již 50 % pacientů s metastatickým postižením. Jediným dnes potenciálně kurativním přístupem je radikální resekce. S ohledem na pozdní diagnózu a špatný výkonnostní stav nemocných podstupuje radikální výkon jen kolem 15–20 % pacientů [13]. V adjuvanci i paliativní chemoterapii se uplatňují zejména nukleotidové antimetabolity. Dnes je uváděn jako lék první volby gemcitabin (2',2'-difluordeoxycytidin).

Gemcitabin

Gemcitabin – 2',2'-difluordeoxycytidin (obr. 1) patří ke druhé generaci nukleosidových analogů. K léčbě karcinomu pankreatu je standardně používán preparát Gemzar, který je využíván i při léčbě NSCLC a karcinomu močového měchýře, v druhé linii i pro nádory ovaria a prsu. Přestože je monoterapie gemcitabinem uváděna jako zlatý standard v léčbě pokročilého adenokarcinomu pankreatu (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Pancreatic Adenocarcinoma V.1.2009. National Comprehensive Cancer Network), je odpověď na terapii gemcitabinem u nádorových buněk pankreatického duktálního adenokarcinomu v některých studiích uváděna jen 12 % a výsledky léčby mezi jednotlivými pacienty se významně liší. V současnosti je vyvíjena maximální snaha o nalezení prediktivních faktorů odpovědi na léčbu gemcitabinem u pacientů s karcinomem pankreatu a individualizaci léčby. Matsubara et al [14] vytvořili skórovací systém (normogram), který v jejich kohortě 304 pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu léčených gemcitabinem dokázal rozlišit vysoce rizikovou skupinu pacientů s krátkým mediánem přežívání do 150 dní ($p = 2 \times 10^{-15}$). Sledovanými parametry tohoto normogramu byly hladiny α 1-antitrypsinu a al-



Obr. 1. Gemcitabin.

kalické fosfatázy v plazmě pacientů, počet leukocytů a performance status.

Chemorezistence je způsobena mnoha různými, pravděpodobně na sobě nezávislými mechanismy. Gemcitabin je transportován do intracelulárního prostoru pomocí nukleosidových transportérů [3], naopak transportéry rodiny ABC způsobují jeho eflux ven z buňky [4]. Intracelulárně dochází k jeho metabolické aktivaci. Preparát je fosforylován deoxycytosinkinázou na gemcitabin-monofosfát a dále konvertován na dFd-dCDP a dFd-dCTP. Vzniklé metabolity gemcitabin-trifosfát a gemcitabin-difosfát [15] zodpovídají za vlastní cytostatický efekt léku.

Na fosforylaci gemcitabinu se může podílet i mitochondriální tymidinkináza (TK2). Substrátová specifita TK2 je však pro gemcitabin výrazně nižší než pro přírodní formy nukleosidů.

Metabolická inaktivace probíhá zejména cestou cytidindeaminázy anebo po fosforylaci cestou deoxycytidindeaminázy (DCTD) [16]. DCTD se účastní reakce, při které vzniká 2'-2' difluordeoxyuridin. Mezi dalšími faktory, které velmi pravděpodobně ovlivňují citlivost, jsou zvýšená oprava DNA a alterace cesty apoptózy [17]. V poslední době je věnováno velké úsilí studiu možností ovlivnění cest buněčné signalizace a úloze genů regulujících buněčný cyklus.

Nukleosidové transportéry

Přestože gemcitabin je hydrofilní látka, pravděpodobně nedochází k jeho významnému průniku přes plazmatickou membránu prostou difúzí. Nukleosidový transport se vyskytuje jako Na^+ -independentní, obousměrný prováděný hENT (human Equilibrative Nucleoside Trans-

porter, označovaný také jako rodina SLC29), nebo jako Na⁺-dependentní, prováděný hCNT (human Concentrative Nucleoside Transporter, rodina SLC28). Zatím je známo sedm nukleosidových transportérů, které se dělí do dvou rodin proteinů: SLC29 (SLC29A2, SLC29A3, SLC29A4, známé rovněž jako hENT1, hENT2, hENT3 a hENT4) a SLC28 (SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3, také označovány jako hCNT1, hCNT2 a hCNT3) [18,19].

Současný výzkum prokázal, že buňky, které nejsou schopny transportu pomocí těchto proteinů, jsou k inhibici gemcitabinem významně rezistentní. Příkladem je např. inhibice nukleosidových transportérů inhibitory typu dipyridamolu [20].

Gemcitabin je podáván jako i.v. bolus v infuzi trvající cca 30 min, a to první, osmý a patnáctý den 28denního cyklu, nebo jednou týdně po dobu dvou měsíců. Peak v séru dosahuje maximálně 50mM a deaminace způsobí rychlý pokles plazmatické koncentrace, takže v průběhu 2 hod spadne pod hranici stanovitelnosti. Předpoklad, který z toho vyplývá, je, že buňky jsou vystaveny gemcitabinu v signifikantní koncentraci jen krátkou dobu a neúčinný buněčný uptake je s největší pravděpodobností jedním z mechanismů chemorezistence [20].

Gemcitabinový uptake je zajišťován 4 transportéry: hENT1 \cong hCNT1 > hENT2 > hCNT3 [20]. Ve tkáních pankreatu je exprimován hENT1, hENT2 [19], ale vyskytují se zde i hCNT transportéry (hCNT1, hCNT2, hCNT3), jejichž exprese v nádorových tkáních je velmi variabilní [20]. Hlavní mechanismus příjmu gemcitabinu buňkou je tedy pravděpodobně zajišťován hENT transportéry, protože aktivita hCNT1 byla demonstrována pouze v ledvinách, játrech, střevu a hCNT3 jen v leukemických buňkách a v buňkách kolořektálního karcinomu [22].

Studie *in vitro* ukázaly, že gemcitabin je do buněk transportován převážně díky hENT1 transportéru [21] a použití inhibitorů, jako je nitrobenzyl-merkaptopurin-ribosid či dipyridamol, snížilo více než 20násobně citlivost ke gemcitabinu [20]. Imunohistochemická studie na nádorových tkáních od 21 pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu ukázala, že pacienti s expresí hENT1 měli významně

delší medián přežití než ti s nízkou expresí či absencí hENT1 (13 vs 4 měsíce, $p = 0,01$) [23]. Podobné výsledky ukazuje i farmakogenetická studie na 83 pacientech, kdy byla exprese analyzována pomocí PCR. Dle autorů bylo celkové přežívání delší u pacientů s vysokou hladinou transkriptů hENT1 (25,7 vs 8,5 měsíce) [24].

ABC transportéry

Chemorezistence je způsobena mnoha různými, pravděpodobně na sobě nezávislými mechanismy. Jedním z důležitých mechanismů je snížená akumulace léčiva v nádorových buňkách způsobená jeho zvýšeným únikem (eflux). Ten je zprostředkován proteiny, které z velké části přísluší k nadrodině ABC transportérů (human ATP-binding cassette transporters). K dnešnímu datu bylo v lidském genomu identifikováno 49 různých ABC transportérů. Dělí se do 7 tříd (A-G) na základě sekvenční podobnosti. Prvním popsaným lidským ABC transportérem byl P-glykoprotein (ABCB1) [25]. Následně byl izolován z buněk buněčné linie bronchogenního karcinomu MRP1 (ABCC1) [26]. Ukázalo se, že zejména zástupci rodiny ABCB, ke které se řadí i P-glykoprotein [22] a rodiny ABCC [27], jsou zodpovědné za mnohočetnou lékovou rezistenci, tzv. MDR (multiple drug resistance). Kromě uvedených transportérů lze jmenovat i další transportéry, např. BCRP (ABCG2) [28].

ABCB1 (MDR1, P-glykoprotein)

ABCB1, nazývaný také MDR1 či P-glykoprotein, je nejdéle známý a v současnosti nejlépe prostudovaný zástupce ABC transportérů. Substrátem ABCB1 jsou obecně hydrofobní léky s polyaromatickým jádrem a neutrálním nebo kladným nábojem, např. etoposid, adriamycin, vinblastin [29]. Dříve provedené studie prokázaly, že genetické polymorfizmy v *ABCB1* genu jsou důležitou determinantou jeho exprese a funkce [30] a obecně ovlivňují odpověď na farmakoterapii [31]. Dle závěrů japonských studií [32,33] vykazují haplotypy *ABCB1* významnější vztah k míře exprese než jednotlivé polymorfizmy. Proto lze předpokládat, že haplotypy mohou lépe určit vztah mezi genotypem a fenotypem tohoto trans-

portéru a velmi pravděpodobně bude tento princip univerzální. Vysoce pozitivní imunohistochemické barvení pro P-glykoprotein bylo nalezeno u 73 % duktálních adenokarcinomů pankreatu ($n = 103$), přičemž exprese *ABCB1* genu byla detekována ve všech vyšetřených tumorech, a to ve zvýšené míře oproti normální tkáni slinivky břišní. Vyšší míra exprese *ABCB1* dle autorů významně korelovala s lepší prognózou a byla uvedena do souvislosti s menší biologickou agresivitou nádoru. Dále byla nalezena vyšší exprese *ABCB1* v dobře diferencovaných nádorech oproti těm hůře diferencovaným [34]. Na tuto studii navázala skupina autorů [35], v jejichž studii bylo 75 % vzorků karcinomu pankreatu imunohistochemicky pozitivních na přítomnost proteinu ABCB1 ($n = 63$). Pacienti s nízkou či střední expresí proteinu vykazovali delší dobu přežití než pacienti s negativní expresí. Velmi zajímavé bylo, že u případů s vysokým stupněm exprese genu *ABCB1* bylo nalezeno kratší přežívání než u těch s nižší expresí [35]. Exprese *ABCB1* se tedy projevuje jako obecný fenomén vyskytující se v nenádorové i nádorové tkáni, jehož klinický dopad není stále jasný, a jeví se jako aktuální pro podrobné studium v jednotlivých typech nádorů. Na našem pracovišti již probíhá studium *ABCB1* v nádorové tkáni prsu. Mezi první publikované výsledky patří prokázaný vztah mezi jednotlivými polymorfizmy genu *ABCB1* a mírou exprese tohoto genu (resp. hladinou transkriptu v nádorech prsu). Výskyt funkčních polymorfizmů navíc koreloval s prognózou onemocnění (stav estrogenních receptorů) [36].

ABCC (MRP) rodina

ABCC rodina zahrnuje 13 členů, přičemž 9 z nich se řadí mezi tzv. multidrug resistance proteins (MRP1-MRP9, resp. ABCC1-ABCC6 a ABCC10-ABCC12). ABCC transportéry jsou integrální membránové proteiny způsobující ATP-dependentní export organických iontů ven z buněk. ABCC1-6 transportují lipofilní složky konjugované s glutathionem, glukuronátem či sulfátem. Substráty pro ABCC4, ABCC5 a ABCC11 zahrnují také cyklické nukleotidy a nukleotidová analoga [37–39]. ABCC4 byl navíc iden-

Tab. 1. Známé údaje o expresi a účincích ABCB1, ABCG2 a ABCC rodiny u nádorů pankreatu.

Gen	Protein	OMIM	Lokus	Vztah k rezistenci/citlivosti ke skupině léčiv – nukleotidová analoga	Přítomnost ve zdravé tkáni pankreatu	Přítomnost ve tkáni karcinomu pankreatu	Reference
ABCB1	MDR1	171050	7q21	zvýšení citlivosti	ano	ano	41,35,34
ABCC1	MRP1	158343	16p13	zvýšení citlivosti	ano	ano	41,40
ABCC2	MRP2	601107	10q24	neprokázán	ano	ano	40
ABCC3	MRP3	604323	17q22	neprokázán	ano	ano	40
ABCC4	MRP4	605250	13q32	navození rezistence	ano	ano	51,40,37
ABCC5	MRP5	605251	3q27	navození rezistence	ano	ano	40,42,37
ABCC6	MRP6	603234	16p13	neznámý	ano	ano	40
ABCC10	MRP7	není	6p12	neznámý	ano	ano	40
ABCC11	MRP8	607040	16q12	navození rezistence	ne	ne	50,40
ABCC12	MRP9	607041	16q12	neznámý	ano	ne	40
ABCG2	BCRP	603756	4q22	jsou substrátem	ano	ano	47,52,40,28

tifikován jako kotransportér pro redukovaný glutathion se žlučovými solemi a transportér prostaglandinů a DHEAS (dihydroepiandrosteron-3-sulfát).

Ve zdravé tkáni pankreatu i v ductálním adenokarcinomu jsou exprimovány geny *ABCC1-6* a *ABCC10*, zatímco gen *ABCC12* (kódující protein MRP9) byl prozatím detekován jen v normálním parenchymu slinivky břišní. Exprese *ABCC3* proteinu je v nádorových vzorcích zvýšená a koreluje s gradíngem nádoru [40]. *In vitro* studie prokázala, že zvýšená exprese *ABCB1* a *ABCC1* způsobuje buněčný stres, jehož důsledkem je i zvýšený metabolismus gemcitabinu a zvýšená vnímavost buněk k jeho působení [22]. Oguri et al [42] prověřili expresi genu *ABCC5* na buněčných liniích NSCLC (non-small cell lung cancer) a poukázali na korelaci mezi jeho expresí a rezistencí vůči gemcitabinu. Při inkubaci s inhibitorem *ABCC5* (zaprinast) dochází ke zvýšení citlivosti buněk (tj. cytotoxicity gemcitabinu), což bylo potvrzeno i užitím siRNA.

Dosud známé údaje o expresi a účincích *ABCB1*, *ABCG2* a *ABCC* rodiny u nádorů pankreatu jsou shrnuty v tab. 1.

ABCG2 (BCRP – breast cancer resistance protein)

Podobně jako u *ABCB1* vede i v případě genu *ABCG1* jeho zvýšená exprese ke vzniku mnohočetné lékové rezistence v nádorových buňkách. *ABCG2* je polo-

vičním transportérem a k jeho správné funkci je třeba vytvoření homodimerní nebo oligomerní efluxní membránové pumpy spojením dvou anebo více proteinů [43].

Substrátem pro *ABCG2* je řada cytostatik, např. topotekan, irinotekan metotrexát, a většina nukleosidových analog včetně gemcitabinu [44,45]. *ABCG2* je exprimován v řadě zdravých tkání včetně slinivky a jeho exprese byla detekována i v nádorových buňkách karcinomu pankreatu [40]. Zhou et al demonstrovali přítomnost tzv. side population cells v buněčné linii PANC-1. Tato buněčná linie měla výrazně vyšší expresi *ABCB1* a *ABCG2* transportérů, což může významně přispívat k její známé lékové rezistenci. Po třídní kultivaci s gemcitabinem došlo k nárůstu populace těchto buněk. Autoři usuzují, že se může jednat o kandidátní nádorové kmenové buňky, které se účastní relapsu onemocnění [46].

ABCG2 navíc vykazuje spolu s P-glykoproteinem silnou tendenci k interakcím s klinicky významnými inhibitory kináz včetně erlotinibu [47].

Erlotinib (Tarceva) inhibuje receptor typu 1 pro epidermální růstový faktor (EGFR, známý také jako HER1) mechanismem selektivní intracelulární inhibice fosforylace EGFR-asociovaných tyrozin kináz, čímž vyvolává změnu proliferační aktivity buněk.

Erlotinib je aktivně transportován do buněk pomocí *ABCB1* a *ABCG2* transportérů *in vitro* [48]. V souladu s tímto tvrzením byla i *in vivo* nalezena vyšší biologická dostupnost erlotinibu po perorálním podání u myši, které měly tyto dva transportéry inaktivovány, oproti zvířatům, která měla tyto transportéry aktivní [48].

Závěr

Karcinom pankreatu patří k nádorovým onemocněním s velmi vážnou prognózou a pětiletým přežitím pod 5%, a to i přes celosvětovou snahu o hledání účinnější léčby, včetně léčby biologické. V současnosti se za neúčinnější dostupnou léčbu považuje kombinovaná terapie: gemcitabin (Gemzar) a erlotinib (Tarceva). Pacienti s pokročilým karcinomem pankreatu léčení touto kombinací dosahují jednoletého přežití až ve 20% [49].

Chemorezistence je způsobena mnoha různými, pravděpodobně na sobě nezávislými mechanismy. Nicméně jak u gemcitabinu, tak i u erlotinibu byl *in vitro* i *in vivo* prokázán významný vliv membránových transportérů na biologickou dostupnost a účinnost těchto preparátů.

Gemcitabin je transportován do intracelulárního prostoru pomocí nukleosidových transportérů. Transportéry rodiny ABC pak způsobují vypumpování jak gemcitabinu, tak i erlotinibu ven z buňky.

Genetické alterace v genech, které kódují transportéry, mohou být u pacientů s karcinomem pankreatu jedním z potenciálních prediktivních faktorů pro individualizovanou chemoterapii.

Literatura

- Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* 1995; 273(20): 1605–1609.
- Mukesh V. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat* 2005; 4: 295–301.
- Klener P et al. *Klinická onkologie*. Praha: Galén 2002: 429–433.
- Almoguera C, Shibata D, Forrester K et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53(4): 49–54.
- Li D, Xie K, Wolff R et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004; 363(9414): 1049–1057.
- Porta M, Malats N, Jarrod M et al. Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group. *Lancet* 1999; 354(9196): 2125–2129.
- Terhune PG, Phifer DM, Tosteson TDet al. K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(6): 515–521.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88(5): 593–602.
- Hirano T, Shino Y, Saito T et al. Dominant negative MEKK1 inhibits survival of pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2002; 21(38): 5923–5928.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296(5567): 550–553.
- Kawesha A, Ghaneh P, Skar R et al. K-ras oncogene subtype mutations are associated with survival but not expression of p53, p16(INK4A), p21(WAF-1), cyclin D1, erbB-2 and erbB-3 in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000; 89(6): 469–474.
- Finkelstein SD, Przygodzki R, Pricolo VE et al. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer* 1993; 71(12): 3827–3888.
- Pannala R, Basu A, Petersen GM et al. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol* 2009; 10(1): 88–95.
- Matsubara J, Ono M, Honda K et al. Survival prediction for pancreatic cancer patients receiving gemcitabine treatment. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9(4): 695–704.
- Heinemann V, Hertel LW, Grindley GB et al. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 1988; 48(14): 4024–4031.
- Plunkett W, Huang P, Xu YZ et al. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol* 1995; 22: 3–10.
- Erkan M, Kleeff J, Esposito I et al. Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene* 2005; 24(27): 4421–4432.
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY et al. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 2004; 447: 735–743.
- Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 2004; 447(5): 728–734.
- Mackey JR, Mani RS, Selner M et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; 58(19): 4349–4357.
- García-Manteiga J, Molina-Arcas M, Casado FJ et al. Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine-induced cytotoxicity. *Clin Can Res* 2003; 9(13): 5000–5008.
- Bergman AM, Pinedo HM, Talianidis I et al. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br J Cancer* 2003; 88(12): 1963–1970.
- Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D et al. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(20): 6956–6961.
- Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V et al. Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Res* 2006; 66(7): 3928–3935.
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986; 47(3): 381–389.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258(5088): 1650–1654.
- Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty CH, Sauna ZE et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22(47): 7468–7485.
- Borst P, Evers R, Kool M et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(16): 1295–1302.
- Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6(1): 92–97.
- Rabow AA, Shoemaker RH, Sausville EA et al. Mining the National Cancer Institute's tumor-screening database: identification of compounds with similar cellular activities. *J Med Chem* 2002; 45(4): 818–840.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1): 48–58.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(1): 13–33.
- Takane H, Kobayashi D, Hirota T et al. Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311(3): 1179–1187.
- Taniguchi S, Mochida Y, Uchiyama T et al. Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in the colon. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(12): 1351–1359.
- Suwa H, Ohshio G, Shinji A et al. Immunohistochemical localization of P-glycoprotein and expression of the multidrug resistance-1 gene in human pancreatic cancer: relevance to indicator of better prognosis. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87(6): 641–649.
- Lu Z, Kleeff J, Shrikhande S et al. Expression of the multidrug-resistance 1 (MDR1) gene and prognosis in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2000; 21(3): 240–247.
- Václavíková R, Nordgard SH, Alnaes GI et al. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18(3): 263–273.
- Reid G, Wielinga P, Zelcer N et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1094–1103.
- Chen ZS, Guo Y, Belinsky MG et al. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Cancer Ther* 2005; 6(2): 545–557.
- Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L et al. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(13): 7476–7481.
- Konig J, Hartel M, Nies AT et al. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 115(3): 359–367.
- Oguri T, Achiwa H, Sato S et al. The determinants of sensitivity and acquired resistance to gemcitabine differ in non-small cell lung cancer: a role of ABCC5 in gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(7): 1800–1806.
- Kage K, Fujita T, Sugimoto Y. Role of Cys-603 in dimer/oligodimer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ACG2. *Cancer Sci* 2005; 96(12): 866–872.
- de Wolf C, Jansen R, Yamaguchi H et al. Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(9): 3092–3102.
- Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003; 22(47): 7340–7358.
- Zhou J, Wang CY, Liu T et al. Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14(6): 925–930.
- Shi Z, Peng XX, Kim IW et al. Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res* 2007; 67(22): 11012–11020.
- Marchetti S, de Vries NA, Buckle T et al. Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCG2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1-/-/Mdr1a/1b-/- (triple-knockout) and wild-type mice. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(8): 2280–2287.
- Ardavanis A, Kountourakis P, Karagiannis A et al. Biweekly gemcitabine (GEM) in combination with erlotinib (ERL): an active and convenient regimen for advanced pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2009; 29(12): 5211–5217.
- Guo Y, Kotova E, Chen Z et al. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem* 2003; 278(32): 29509–29514.
- Takenaka K, Morgan JA, Scheffer GL et al. Substrate overlap between MRP4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Res* 2007; 67(14): 6965–6972.
- Okazaki T, Javle M, Tanaka M et al. Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin Cancer Res* 2010; 16(1): 320–329.

Příloha č. 11

Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P.

The Role of Membrane Transporters in Cellular Resistance of Pancreatic Carcinoma to Gemcitabine and Erlotinib.

Horizons in Cancer Research, Volume 46, (Hiroto S. Watanabe ed.), NOVA Science Publishers Inc., NY, USA, **2011**.

The Role of Membrane Transporters in Cellular Resistance of Pancreatic Carcinoma to Gemcitabine and Erlotinib

B. Mohelnikova-Duchonova^{1,2} and *P. Soucek*¹

1. Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health,
Prague, Czech Republic
2. 1st Faculty of Medicine Charles University in Prague,
Czech Republic

Abstract

Background: Pancreatic cancer remains an important health problem and belongs to one of the most difficult conditions to treat. The etiology and molecular pathogenesis of the disease is still weakly understood. Gemcitabine is a cytotoxic nucleoside analog, which is nowadays the standard chemotherapeutic drug for patients with advanced pancreatic cancer. Inter-individual differences in gemcitabine pharmacokinetics and pharmacodynamics have been demonstrated. Resistance of tumor cells against the nucleoside analogs limits their clinical use and it may seriously contribute to the fact that 5-years survival of the pancreatic carcinoma is about 5%. The first results of targeted therapies have shown promising results in various cancers. However, until now just erlotinib (an epidermal growth-factor receptor tyrosine kinase inhibitor) has demonstrated modest survival benefit in phase III clinical trial on pancreatic cancer when combined with gemcitabine. However, its clinical significance has been criticized and its cost-effectiveness is low.

Aim: This review provides survey of available data concerning the molecular factors contributing to the resistance of pancreatic carcinoma against gemcitabine and erlotinib. Mechanisms of transport of these drugs into and outside of the tumor cells and perspectives of their use in personalized medicine will also be discussed.

Introduction

Pancreatic carcinoma (ICD-10: C.25; OMIM: 260350) is one of the most severe form of malignant disease with high mortality. It is the fourth leading cause of cancer-related deaths, with only about 5% of patients surviving by 5 years. This figure has remained relatively unchanged over the past 25 years [1]. The etiology and molecular pathogenesis of the disease is still weakly understood. Known risk factors for the disease include age, sex, late-onset diabetes, chronic or hereditary pancreatitis, familial cancer syndromes, cigarette smoking, dietary habits and infection by *Helicobacter pylori* [2,3]. Furthermore, low-penetrance genes, e.g. those coding xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA repair and cell-cycle regulating machinery may be relevant factors modifying an individual susceptibility [4, 5].

The prognosis of patients with pancreatic cancer remains very poor. Operative resection is the only therapeutic option with curative potential, but just 10-15% of patients have potentially operable tumors, and many of them experience recurrence of the disease despite the radical surgery [6]. Although many studies have evaluated the prognostic factors of pancreatic cancer, their results are mostly inconclusive. The prognosis of operable pancreatic cancer is dependent rather on tumor-related factors, while the prognosis of patients with more advanced pancreatic cancer is dependent on patient-related factors. The onset of symptoms as abdominal pain, back pain, jaundice, general fatigue and nausea closely correlates with prognosis [7]. Tumor markers such as CEA, CA 19-9, CA 72-4, hCG beta and CA 242, C-reactive protein and albumin have limited prognostic value [8-10]. Multivariate analysis showed that CA 19-9, poor tumor differentiation, large tumor size, regional lymph node involvement and venous and/or neural invasion were good prognostic factors for survival in the group of operable patients [11-13]. Interestingly, an extent of blood loss during the surgery and/or a serum albumin level monitored during the first postoperative month seemed to be significant adverse prognostic factors as well [13]. The role of positive resection margin is still discussed and remains controversial [14]. The strongest currently recognized prognostic factors are the extent of the spread of the disease and performance status.

Patients who received chemotherapy or chemoradiotherapy showed better survival than those who received only the best supportive care [15]. Several studies have been performed to determine factors that could predict survival time in gemcitabine-treated patients with advanced pancreatic cancer. The chemotherapy has had poor results, mostly because of the advanced stage of the disease and low chemosensitivity of the pancreatic tumor cells. Gemcitabine, a deoxycytidine analogue, is now the standard drug for treatment of the advanced pancreatic cancer [16]. The first results of targeted therapies have shown promising results in various cancers. However, until now just erlotinib (an epidermal growth-factor receptor tyrosine kinase inhibitor) when combined with gemcitabine has demonstrated modest survival benefit in phase III clinical trial on pancreatic cancer [17]. However, its clinical significance has been criticized and its cost-effectiveness is low. Resistance developed against anticancer drugs significantly limits their clinical use and influences the overall survival. Inter-individual differences in gemcitabine pharmacokinetics and pharmacodynamics have been demonstrated, which may be due to the variability in cellular transport systems enabling the drug to enter the cancer cell (drug uptake) or pumping the drug outside the cell (drug efflux).

This review provides survey of available data concerning the importance of drug transporting enzymes for the resistance of pancreatic carcinoma against gemcitabine and erlotinib as major anticancer drugs used in pancreatic cancer treatment.

Gemcitabine

Gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine, Gemzar, Eli-Lilly, Indianapolis, IN, Figure 1) belongs to the second generation of nucleoside analogues [18].

A pivotal randomized trial found a significant improvement of the one-year median survival rate in patients with advanced pancreatic cancer treated with gemcitabine over those who were treated with 5-fluorouracil (18 vs. 2%; $p=0.0001$) [19]. Despite the fact that gemcitabine became the gold standard of first-line therapy for advanced pancreatic cancer [20], the response rate of pancreatic tumors to gemcitabine remains less than 10% [21,22]. Acquired resistance against gemcitabine demonstrated by inter-individual differences in its pharmacokinetics and pharmacodynamics contributes to this fact.

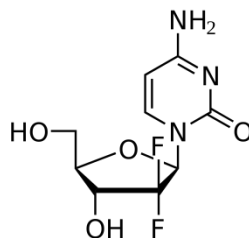


Figure 1. Structure of gemcitabine.

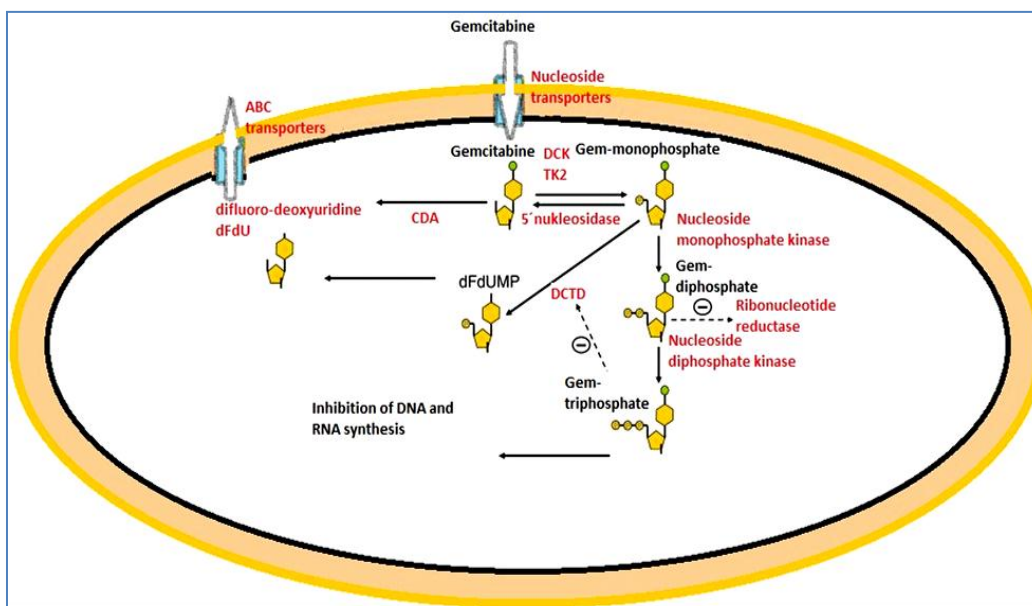


Figure 2. Cellular metabolism and mechanism of gemcitabine.

Drug resistance may be attributed to different, unrelated mechanisms, including abnormal membrane transport, ineffective metabolic drug conversion, enhanced metabolite inactivation, increased DNA repair and alterations in the apoptotic pathways (Figure 2, [23,24]).

Gemcitabine is transported into the cell via nucleoside (SLC) transporters, whereas several members of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily cause its efflux. Gemcitabine (dFdC) is phosphorylated to its monophosphate mainly by deoxycytidine kinase (DCK, OMIM:125450). It may also be phosphorylated by thymidine kinase 2 (TK2, OMIM:188250) but the substrate specificity of TK2 for gemcitabine is, just 5–10% of that for deoxycytidine [25]. Gemcitabine monophosphate is then converted to diphosphate and triphosphate (dFdCTP) responsible for the major cytostatic effect [26,27]. The gemcitabine-triphosphate incorporates into DNA and causes chain termination [28] and inhibits CTP synthetase (CTPS, OMIM:123860) and dCMP deaminase (DCTD, OMIM:607638) [24]. Gemcitabine is also known to incorporate to RNA [29]. The active gemcitabine-diphosphate also inhibits DNA synthesis indirectly through the inhibition of ribonucleotide reductase (subunits RRM1 and RRM2, OMIM:180410 and 180390). This inhibition causes a decrease of competing nucleoside pools as the RRM is a unique enzyme converting ribonucleotides to deoxyribonucleotides required for DNA polymerization and repair [30,31]. Gemcitabine is inactivated mainly by cytidine deaminase (CDA, OMIM:123920) mediated conversion to difluorodeoxyuridine (dFdU) and partly by DCTD to difluorodeoxyuridine-monophosphate [24].

Research addressing the pharmacogenomics of gemcitabine so far focused mainly at inter-individual differences in gemcitabine pharmacokinetics and variation in genes coding transmembrane proteins such as ABC and SLC transporters and gemcitabine-metabolizing enzymes such as DCK, RRM, DCTD, CDA [32-37].

ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters

One of the most important mechanisms of the drug resistance is low accumulation of the drug in cancer cells caused by increased efflux. The efflux is performed mainly by transmembrane ABC transporters.

The human family of ABC transporters has 49 members divided into 7 subfamilies (named ABCA - ABCG based on sequence similarities, ref. 38). Fourteen ABC transporters which may be divided into two groups have been shown to determine drug resistance in cancer cells (Table 1). First group contains proteins causing so called “multi drug resistance” (MDR) phenotype in both cell lines and patients with various types of cancers. ABCB1 (or MDR1, OMIM:171050), ABCC1 (MRP1, OMIM:158343) and ABCG2 (BCRP, OMIM:603756) belong to this group. In the second group of transporters (i.e. ABCA2, OMIM:600047; ABCB4, OMIM:171060; ABCB11, OMIM:603201; ABCC2, OMIM:601107; ABCC3, OMIM:604323, ABCC4, OMIM:605250; ABCC5, OMIM:605251; ABCC6, OMIM:603234; ABCC10, OMIM:612509; and ABCC11, OMIM:607040; ABCC12, OMIM:607041) the ability to confer drug resistance has been demonstrated just in limited number of experiments [39].

ABCA2 is highly expressed in the cells of the nervous and hematopoietic systems and is associated with lipid transport and drug resistance in cancer cells. Recently, a single

nucleotide polymorphism (SNP) in *ABCA2* was linked to early onset of Alzheimer's disease (reviewed in 40). Data on *ABCA2* expression and genetic variability in pancreatic tissue were not published so far.

ABCB1 (P-glycoprotein) is the first human ABC transporter cloned and characterized through its ability to confer a MDR phenotype in cancer cells. *ABCB1* substrates are generally hydrophobic drugs with polyaromatic nucleus, such as adriamycin, etoposide or vinblastine [41]. SNPs in *ABCB1* have been shown to influence its phenotype (expression, protein function and drug response) in context with numerous diseases [42-44]. *ABCB1* mRNA and P-glycoprotein levels were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and by immunohistochemistry (IHC) in 2 pancreatic cancer cell lines SW1990 and CAPAN-1 [45]. Jensen et al. 1997 found higher sensitivity to gemcitabine in small-cell lung cancer (SCLC) cells with overexpressed *ABCB1* [46]. Similarly, non-small cell lung cancer (2R160), ovarian (2780ADd), and epidermoid (KB8-5e) cell lines with *ABCB1* overexpression were also highly sensitive to gemcitabine [47]. High intensity of IHC staining for P-glycoprotein was observed in 73.2% of pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC, n=103) [48] and the staining inversely correlated with grade, tumor size, and retroperitoneal and portal invasion. *ABCB1* gene expression was significantly higher in pancreatic tumors compared to unaffected tissue and high expression levels seemed to be factor of better prognosis in patients with PDAC. Accordingly, northern blot analysis showed that *ABCB1* mRNA levels were increased by 1.4-fold in the pancreatic cancer samples compared with the normal pancreas. Another study found IHC positivity of P-glycoprotein in 75% of pancreatic cancer samples (n=63). Patients with weak to moderate staining had longer overall survival than patients without P-glycoprotein expression. In contrast, strong staining was associated with shorter survival compared with weak to moderate staining. The authors suggested that overexpression of other drug resistance genes (such as *ABCB2*) could possibly exert a compensatory effect [49].

Thus, the *ABCB1* (or P-glycoprotein) expression seems to be a quite common phenomena in both tumor and adjacent non-tumor tissue and its clinical utility as prognostic or predictive factor remains unclear. However, from so far published promising results of functional and observational studies it seems worth to continue in study of complex relations between tumor phenotype and *ABCB1* genotype and protein function.

The ABCC family contains 13 members, 9 of them are the multidrug resistance-associated proteins (*ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCC6*, *ABCC10*, *ABCC11*, *ABCC12*). *ABCC7* (CFTR, OMIM:602421) is a chloride channel associated with cystic fibrosis. *ABCC8* and *ABCC9* (OMIM:600509 and 601439) are the sulfonylurea receptors and *ABCC13* is clearly a pseudogene without transporting activity [50]. *In vitro*, ABCC transporters can collectively confer resistance to natural product-derived anticancer drugs and their conjugated metabolites, platinum compounds, folate antimetabolites, nucleoside and nucleotide analogues, arsenical and antimonial oxyanions, peptide-based agents, and (in concert with alterations in phase II conjugating or biosynthetic enzymes) also alkylating agents (reviewed in 51). The doxorubicin-resistant lung cancer cells 2R120 (overexpressing *ABCC1*) and 2R160 (overexpressing *ABCB1*) were nine- and 28-fold more sensitive to gemcitabine than their parental SW1573 line, respectively ($P < 0.01$). In 2R120 and 2R160 cells, DCK activities were seven- and four-fold higher than in SW1573, respectively. Thus, *ABCB1* and *ABCC1* overexpression possibly caused a cellular stress resulting in increased gemcitabine metabolism and sensitivity [47].

ABCC4 and ABCC5 transport nucleoside monophosphates [52,53]. Davidson et al. [34] found a substantial resistance to cytarabine, gemcitabine, and cladribine in ABCC5-overexpressing HEK293 cells. However, Reid et al. [54] observed no ABCC4- or ABCC5-mediated resistance against cytarabine, gemcitabine, or fludarabine in ABCC4- and ABCC5-overexpressing HEK293 cells. To clarify these contradictory results, Oguri et al. [35] examined the expression levels of *ABCC5* gene in non-small cell lung cancer cell lines. The ABCC5 expression levels inversely correlated with gemcitabine sensitivity. Furthermore, the treatment with the ABCC5 inhibitor zaprinast altered the sensitivity in ABCC5-expressing cells and it was confirmed by using siRNA as well [35]. Therefore, ABCC5 remains an intriguing target for future studies on drug resistance to gemcitabine.

ABCC10 gene expression assessed by quantitative PCR in different adult and fetal tissues and various tumors was found to be highest in pancreas. Moreover, ABCC10 mRNA levels were remarkably increased in doxorubicin-treated MCF7 cells. Conversely, in TP53-dominant-negative MCF7 cells the ABCC10 upregulation was suppressed. These results suggested that ABCC10 expression is regulated in a TP53-dependent manner and thus it may vary in concordance with DNA damage-induced apoptosis [55]. However, neither cAMP nor cGMP were found to be transported by ABCC10 [56].

ABCC11 is an amphipathic anion transporter able to efflux cAMP and cGMP and functions as a resistance factor for commonly used purine and pyrimidine nucleotide analogs. Analysis of the sensitivity of ABCC11-overexpressing cells (LLC-PK1) revealed that they are resistant to a range of clinically-relevant nucleotide analogs [57].

Konig et al. [58] quantified the mRNA expression of nine ABCC family members and of ABCG2 in normal human pancreas and in pancreatic carcinoma (n = 37). The expression of ABCC1, ABCC3, ABCC4 and ABCC5 mRNA in normal pancreatic tissue and in pancreatic carcinoma samples was found using real-time PCR. cDNA fragments of the length corresponding to ABCC2, ABCC6, ABCC10 and ABCC12 were also identified but the relative quantification to the respective beta-actin mRNA levels has shown that their amplification was very low. ABCC11 fragment was not amplified at all. The ABCC1 and ABCC4 mRNA levels did not significantly differ between the normal pancreas and the tumor tissues. On the other hand, the expression of ABCC3 mRNA was upregulated in pancreatic carcinoma samples and correlated with tumor grade. The ABCC5 expression was upregulated in carcinomas as well but did not correlate with tumor characteristics. The authors suggested that ABCC3 and ABCC5 are involved in drug resistance of pancreatic tumors and analysis of their expression may contribute to the prediction of the chemotherapy outcome. It is interesting that the ABCC12 was detected in normal pancreatic tissue only [58]. Although numerous SNPs in ABCC genes exist, their association with clinical phenotype mostly remains to be clarified [59].

The human ABCG2-transfected HEK293 cells are gemcitabine-resistant [60]. Five pancreatic carcinoma cell lines tested by real-time PCR expressed significantly higher levels of ABCG2 mRNA than non-malignant fibroblasts. Flow cytometry indicated the presence of ABCG2 on the cell surface of these cell lines, although ABCG2 protein levels did not correlate very well with the mRNA expression [61]. cDNA fragments of ABCG2 with the expected length were amplified in both pancreatic normal and carcinoma samples. However, ABCG2 mRNA levels in the normal tissues did not significantly differ from those in tumors [58].

Table 1. Expression and function of ABCB1, ABCG2 and ABCC family in pancreatic cancer

Gene	Protein	OMIM	Locus	Activity towards nucleoside analogs	Expression in pancreas	Expression in tumor	Reference
<i>ABCB1</i>	MDR1	171050	7q21	Increased sensitivity	Yes	Upregulated	38,45-49
<i>ABCC1</i>	MRP1	158343	16p13	Increased sensitivity	Yes	Unchanged	38, 47, 58
<i>ABCC2</i>	MRP2	601107	10q24	Unknown	Yes	Yes	38, 58
<i>ABCC3</i>	MRP3	604323	17q22	Unknown	Yes	Upregulated	38, 58
<i>ABCC4</i>	MRP4	605250	13q32	None	Yes	Unchanged	38, 54, 58
<i>ABCC5</i>	MRP5	605251	3q27	Increased resistance	Yes	Upregulated	34, 35, 38, 58
<i>ABCC6</i>	MRP6	603234	16p13	Unknown	Yes	Yes	38, 58
<i>ABCC10</i>	MRP7	612509	6p12	Unknown	Yes	Yes	38, 58
<i>ABCC11</i>	MRP8	607040	16q12	Increased resistance	Yes	Yes	38, 57, 58
<i>ABCC12</i>	MRP9	607041	16q12	Unknown	Yes	No	38, 58
<i>ABCG2</i>	BCRP	603756	4q22	Increased resistance	Yes	Unchanged	38, 58, 60

Nucleoside Transporters

Gemcitabine is a hydrophilic substance and thus, it is not expected to permeate membranes by passive diffusion. Its cellular uptake is managed predominantly by specialized membrane nucleoside transporters [62]. Nucleoside transport occurs by sodium-dependent, inwardly directed concentrative process performed by hCNT (human Concentrative Nucleoside Transporter, belonging to SLC28 family) or by sodium-independent, bidirectional equilibrative process performed by hENT (human Equilibrative Nucleoside Transporters, belonging to SLC29 family). In humans, 7 nucleoside transporters divided into the above mentioned 2 families exist: SLC28A1 (hCNT1, OMIM:606207), SLC28A2 (hCNT2, OMIM:606208) and SLC28A3 (hCNT3, OMIM: 608269), SLC29A1 (hENT1, OMIM:602193), SLC29A2 (hENT2, OMIM:602110), SLC29A3 (hENT3, OMIM:612373), SLC29A4 (hENT4, OMIM:609149) [63,64].

Gemcitabine is routinely administered weekly as an i.v. bolus infusion lasting 30-60 minutes in doses ranging from 800 to 1200 mg/m² and the peak of serum concentration does not exceed 50 µM. From this fact it is obvious that tumor cells are *in vivo* exposed to effective

gemcitabine concentration for quite short time period and therefore inefficient cellular uptake could be an underlying mechanism for the observed resistance in some solid tumors [62]. Using the panel of 12 different cell lines it has been shown that functional nucleoside transporters are required for manifestation of gemcitabine toxicity *in vitro*. The efficiency of gemcitabine uptake varied markedly among the cell lines with expression of single transporters: SLC29A1 \approx SLC28A1 > SLC29A2 > SLC28A3 >>> SLC28A2 [62]. Human pancreatic adenocarcinoma cells NP9, NP18, NP29, and NP31 overexpressed predominantly SLC29A1. The other transporters: SLC29A2, SLC28A1, SLC28A2 and SLC28A3 were expressed as well but their expression levels differed among the cell lines, with apparent selective loss or decrease of SLC28A mRNAs [36]. Exposure to 20 μ M gemcitabine for 1h elicited upregulation of ABCC1, ABCC3, ABCC5 and SLC29A1 transporters *in vitro* suggesting a possible induction of drug resistance [65]. Cell lines lacking SLC29A1 are highly resistant to gemcitabine [62,66] and patients with PDAC with detectable SLC29A1 protein by IHC had a significantly longer survival after gemcitabine chemotherapy than patients whose tumors did not express SLC29A1 (13 vs. 4 months, $p=0.01$, $n=21$) [67]. This observation was supported by the study on 31 patients with inoperable biliary tract cancer treated by first-line gemcitabine-based regimen. SLC29A1 expression significantly correlated with time to progression (6.33 vs. 2.83 months, $p=0.04$) and patients with positive SLC29A1 IHC expression showed a longer but non-significant median survival (14 vs. 7 months, $p=0.13$). There were no significant associations between adverse drug toxicities, tumor response and SLC29A1 levels [37]. High SLC28A3 expression has also been associated with longer overall survival of patients with PDAC treated by gemcitabine-based chemoradiation after curative resection ($n=45$). Furthermore, the combined analysis has shown that, patients with both favorable prognostic factors (high SLC29A1 and SLC28A3 expression, $n=15$) had a longer overall survival (median survival, 94.8 months) than those having just one factor (18.7 months) or none (12.2 months) [68]. Therefore, expression of SLC29A1 and probably also other nucleoside transporters like SLC28A3 may become relevant predictive marker(s) of the outcome of cancer patients treated by gemcitabine-based regimen.

Erlotinib and ABC Transporters

Erlotinib hydrochloride (OSI-774, Tarceva, CP-358774) is an orally active small molecule that blocks downstream intracellular signalling of epidermal growth factor receptor (EGFR, OMIM:131550) by binding to its ATP binding site essential for tyrosine kinase activity (Figure 3). The signaling pathways of tyrosine kinases as EGFR are involved in cancer cell proliferation, apoptosis, angiogenesis and metastasis [69,70]. Erlotinib has been approved for the treatment of a locally advanced inoperable or metastatic pancreatic cancer in combination with gemcitabine [71].

Erlotinib is metabolized by several isoforms of the P450 enzymes (CYP), predominantly by CYP3A4 (OMIM:124010) and CYP3A5 (OMIM:605325), less by CYP1A1 (OMIM:108330), CYP1A2 (OMIM:124060), CYP1B1 (OMIM: 601771), CYP2D6 (OMIM:124030) and CYP2C8 (OMIM: 601129).

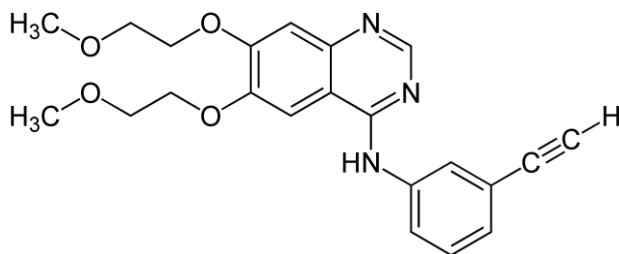


Figure 3. Structure of erlotinib.

The main circulating metabolites of erlotinib are products of the *O*-demethylation of the side chains (such as OSI-420 and OSI-413) [72-74]. Erlotinib is also a substrate for ABCB1 and ABCG2 but not ABCC2 *in vitro* [75]. The absence of ABCB1 and ABCG2 significantly affected the oral bioavailability of erlotinib in mice *in vivo*. Erlotinib also inhibited the ABCB1-, ABCG2- and ABCC10-mediated efflux at higher drug concentrations [76,77]. ABCG2 SNP (421C>A, Q141K, dbSNP: rs2231142) was associated with increased accumulation of erlotinib and may be relevant to its toxicity and antitumor activity in patients. No significant associations were observed between ABCB1 SNP 3435C>T (rs1045642) and pharmacokinetics of erlotinib [78]. A recently followed diplotype comprised of two polymorphic loci in the ABCG2 promoter (-15622C>T, no rs number assigned yet and 1143C>T, rs2622604) was significantly associated with erlotinib pharmacokinetics parameters, including area under the curve and maximum plasma concentration. Variability in dermal and gastrointestinal toxicity following erlotinib treatment in association with the studied ABCG2 SNPs has been demonstrated as well [79].

No data are available on the activity of erlotinib in relation to genotype or phenotype of the SLC transporter family.

In conclusion, erlotinib is doubtlessly a substrate and may act as inhibitor of ABCB1, ABCG2, and probably also of ABCC10. Such feature may be useful especially in combination with other anticancer drugs which are subject to efflux by these ABC transporters. Further studies on individual variation in genotype and phenotype of membrane transporters are needed to define the treatment modalities, e.g. erlotinib dose and personalized drug combination regimen in order to achieve better outcome of pancreatic cancer therapy.

References

- [1] Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., et al. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.*, 59(4), 225-249.
- [2] Everhart, J. and Wright, D. (1995). Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA*, 273(20), 1605-1609.
- [3] Mukesh, V. (2005). Pancreatic cancer epidemiology. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 4, 295-301.
- [4] Mohelnikova-Duchonova, B., Vrana, D., Holcatova, I., et al. (2010). CYP2A13, ADH1B and ADH1C Gene Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk. *Pancreas*, 39(2), 144-8.

-
- [5] Vrana, D., Pikhart, H., Mohelnikova-Duchonova, B., et al. (2009) The association between Glutathione S-transferase Gene polymorphisms and pancreatic cancer in Central European Slavonic population. *Mutat. Res-Gen. Tox. Environm. Mutag*, 680,78–81.
- [6] Wong, H.H., Lemoine, N.R. (2009) Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*, 6(7), 412-422.
- [7] Watanabe, I., Sasaki, S., Konishi, M., et al. (2004). Onset symptoms and tumor locations as prognostic factors of pancreatic cancer. *Pancreas*, 28(2), 160-165.
- [8] Stocken, D.D., Hassan, A.B., Altman, D.G., et al. (2008). Modelling prognostic factors in advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*, 99(6), 883-893.
- [9] Louhimo, J., Alfthan, H., Stenman, U.H., et al. (2004). Serum HCG beta and CA 72-4 are stronger prognostic factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in pancreatic cancer. *Oncology*, 66(2), 126-131.
- [10] Nakachi, K., Furuse, J., Ishii, H., et al. (2007). Prognostic factors in patients with gemcitabine-refractory pancreatic cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol*, 37(2), 114-120.
- [11] Kim, Y.J., Seo, D.W., Park, K.M. (2008). The prognostic factors of pancreatic cancer can be different according to clinical stages. *Korean J. Gastroenterol*, 51(3), 181-189.
- [12] Perini, M.V., Montagnini, A.L., Jukemura, J., et al. (2008). Clinical and pathologic prognostic factors for curative resection for pancreatic cancer. *HPB (Oxford)*, 10(5), 356-62.
- [13] Ueda, M., Endo, I., Nakashima, M., et al. (2009). Prognostic factors after resection of pancreatic cancer. *World J. Surg*, 33(1), 104-110.
- [14] Kato, K., Yamada, S., Sugimoto, H., et al. (2009). Prognostic factors for survival after extended pancreatectomy for pancreatic head cancer: influence of resection margin status on survival, 38(6), 605-612.
- [15] Park, J.K., Yoon, Y.B., Kim, Y.T., et al. (2008). Survival and prognostic factors of unresectable pancreatic cancer. *J. Clin. Gastroenterol*, 42(1), 86-91.
- [16] Abbruzzese, J.L. (2002). Past and present treatment of pancreatic adenocarcinoma: chemotherapy as a standard treatment modality. *Semin. Oncol*, 29, 2-8.
- [17] Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., et al. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol*, 25, 1960-1966.
- [18] Galmarini, C.M., Clarke, M.L., Jordheim, L., et al. (2004). Resistance to gemcitabine in a human follicular lymphoma cell line is due to partial deletion of the deoxycytidine kinase gene. *BMC Pharmacol*, 4, 8.
- [19] Burris, H.A., Moore, M.J., Andersen, J., et al. (1997). Improvement in survival and clinical benefit with gemcitabine as first line therapy for patients with advanced pancreatic cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol*, 15, 2403-2413.
- [20] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology; Pancreatic Adenocarcinoma v.2.2010. (www.nccn.org, date accessed: 14 October 2010).
- [21] Berlin, J.D., Adak, S., Vaughn, D.J., et al. (2000). A phase II study of gemcitabine and 5-fluorouracil in metastatic pancreatic cancer: and Eastern Cooperative Oncology Group study (E3296). *Oncology*, 58, 215-218.
- [22] Herrmann, R., Bodoky, G., Ruhstaller, T., et al. (2007). Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized,

- multicenter, phase III trial of the swiss group for clinical cancer research and the central European cooperative oncology group. *J. Clin. Oncol*, 25, 2212-2217.
- [23] Erkan, M., Kleeff, J., Esposito, I., et al. (2005). Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene*, 24(27), 4421-4432.
- [24] Heinemann, V., Shulz, L., Issels, R.D., et al. (1995) Gemcitabine: a modulator of intracellular nucleotide and deoxynucleotide metabolism. *Semin. Oncol*, 22, 11-18.
- [25] Wang, L., Munch-Petersen, B., Herrstrom Sjoberg, A., et al. (1999) Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Lett*, 443, 170-174.
- [26] Mackey, J.R., Mani, R.S., Selner, M., et al. (1998). Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res*, 58, 4349-4357.
- [27] Bouffard, D.Y., Laliberte, J., Momparler, R.L. (1993). Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol*, 45, 1857-1861.
- [28] Huang, P., Chubb, S., Hertel, L.W. (1991). Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res*, 51, 6110-6117.
- [29] Ruiz van Happeren, V.W.T., Veerman, G., Vermorken, J.B., et al. (1993). 2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem. Pharmacol*, 46, 762-6.
- [30] Heinemann, V., Xu, Y.Z., Chubb, S., et al. (1990). Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mol. Pharmacol*, 38, 567-572.
- [31] Baker, C.H., Banzon, J., Bollinger, J.M., et al. (1991). 2'-Deoxy-2'-methylenecytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase. *J. Med. Chem*, 34, 1879-1884.
- [32] Gilbert, J.A., Salavaggione, O.E., Ji, Y., et al. (2006). Gemcitabine Pharmacogenomics: Cytidine Deaminase and Deoxycytidylate Deaminase Gene Resequencing and functional genomics. *Clin. Cancer Res*, 12, 1794-1803.
- [33] Davidson, J., Ma, L., Flagella, M. (2004). An increase in the expression of Ribonucleotide Reductase Large Subunit 1 is associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 64, 3761-3766.
- [34] Davidson, J.D., Ma, L., Iverson, P.W., et al. (2002). Human multi-drug resistance protein 5 (MRP5) confers resistance to gemcitabine. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*, 43, 3868.
- [35] Oguri, T., Achiwa, H., Sato, S., et al. (2006). The determinants of sensitivity and acquired resistance to gemcitabine differ in non-small cell lung cancer: a role of ABCC5 in gemcitabine sensitivity. *Mol. Cancer Ther*, 5(7), 1800-1806.
- [36] Garcia-Manteiga, J., Molina-Arcas, M., Casado, F.J., et al. (2003). Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. *Clin. Can. Res*, 9(13), 5000-5008.
- [37] Santini, D., Schiavon, G., Vincenzi, B., et al. (2010). Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1) Levels Predict Response to Gemcitabine in Patients With Biliary Tract Cancer (BTC). *Curr Cancer Drug Targets* [Epub ahead of print].
- [38] <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm> (accessed October 6, 2010)

- [39] Stavrovskaya, A.A. and Stromskaya, T.P. (2008). Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*, 73(5), 592-604.
- [40] Mack, J.T., Brown, C.B., Tew, K.D. (2008). ABCA2 as a therapeutic target in cancer and nervous system disorders. *Expert Opin. Ther. Targets*, 12(4), 491-504.
- [41] Rabow, A.A., Shoemaker, R.H., Sausville, E.A., et al. (2002). Mining the National Cancer Institute's tumor-screening database: identification of compounds with similar cellular activities. *J. Med. Chem*, 45, 818-840.
- [42] Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, 2(1), 48-58.
- [43] Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T., Kim, R.B. (2004). Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther*, 75(1), 13-33.
- [44] Vaclavikova, R., Nordgard, S.H., Alnaes, G.I.G., et al. (2008). Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients, *Pharmacogenet Genomics*, 18(3), 263-273.
- [45] Zhao, Y.P., Zhang, L.Y., Liao, Q., et al. (2004). Detection of multidrug resistant gene 1 in pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int*, 3(2), 307-310.
- [46] Jensen, P.B., Holm, B., Sorensen, M., et al. (1997). In vitro cross-resistance and collateral sensitivity in seven resistant small-cell lung cancer cell lines: preclinical identification of suitable drug partners to taxotere, taxol, topotecan and gemcitabin. *Br. J. Cancer*, 75(6), 869-877.
- [47] Bergman, A.M., Pinedo, H.M., Talianidis, I., et al. (2003). Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, 88(12), 1963-1970.
- [48] Suwa, H., Ohshio, G., Arao, S., et al. (1996). Immunohistochemical localization of P-glycoprotein and expression of the multidrug resistance-1 gene in human pancreatic cancer: relevance to indicator of better prognosis. *Jpn. J. Cancer Res*, 87(6), 641-649.
- [49] Lu, Z., Kleeff, J., Shrikhande, S., et al. (2000). Expression of the multidrug-resistance 1 (MDR1) gene and prognosis in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 21(3), 240-247.
- [50] Annilo, T., Dean, M. (2004). Degeneration of an ATP-binding cassette transporter gene, ABCC13, in different mammalian lineages. *Genomics*, 84(1), 34-46.
- [51] Zhou, S.F., Wang, L.L., Di, Y.M., et al. (2008). Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr. Med. Chem*, 15(20), 1981-2039.
- [52] Schuetz, J.D., Connelly, M.C., Sun, D., et al. (1999). MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat. Med*, 5(9), 1048-1051.
- [53] Wijnholds, J., Mol, C.A., van Deemter, L., et al. (2000). Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(13), 7476-7481.
- [54] Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., et al. (2003). Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol. Pharmacol*, 63(5), 1094-1103.
- [55] Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z.S., et al. (2003). MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for

- fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J. Biol. Chem*, 278(32), 29509-14.
- [56] Takayanagi, S., Kataoka, T., Ohara, O., et al. (2004). Human ATP-binding cassette transporter ABCC10: expression profile and p53-dependent upregulation. *J. Exp. Ther. Oncol*, 4(3), 239-46.
- [57] Kruh, G.D., Guo, Y., Hopper-Borge, E., et al. (2006). ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *Pflugers Arch*, 453(5), 675-84.
- [58] König, J., Hartel, M., Nies, A.T., et al. (2005). Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, 115(3), 359-367.
- [59] Wada, M. (2006). Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Lett*, 234(1), 40-50.
- [60] de Wolf, C., Jansen, R., Yamaguchi, H., et al. (2008). Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides. *Mol. Cancer Ther*, 7(9), 3092-3102.
- [61] Olempska, M., Eisenach, P.A., Ammerpohl, O., et al. (2007). Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int*, 6(1), 92-97.
- [62] Mackey, J.R., Mani, R.S., Kelner, M., et al. (1998). Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res*, 58, 4349-4357.
- [63] Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y., et al. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*, 447, 735-743.
- [64] Gray, J.H., Owen, R.P., Giacomini, K.M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch*, 447, 728-734.
- [65] Hagmann, W., Jesnowski, R., Löhr, J.M. (2010). Interdependence of gemcitabine treatment, transporter expression, and resistance in human pancreatic carcinoma cells. *Neoplasia*, 12(9), 740-747.
- [66] Nakano, Y., Tanno, S., Koizumi, K., et al. (2007). Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer*, 96, 457-463.
- [67] Spratlin, J., Sangha, R., Glubrecht, D., et al. (2004). The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res*, 10(20), 6956-6961.
- [68] Maréchal, R., Mackey, J.R., Lai, R., et al. (2009). Human equilibrative nucleoside transporter 1 and human concentrative nucleoside transporter 3 predict survival after adjuvant gemcitabine therapy in resected pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res*, 15(8), 2913-2919.
- [69] Robinson, D.R., Wu, Y.M., Lin, S.F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19, 5548-5557.
- [70] Ciardiello, F. and Tortora, G. (2001). A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin. Cancer Res*, 7, 2958-2970.
- [71] Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., et al. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase

- III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Clin. Oncol*, 25, 1960-1966.
- [72] Johnson, J.R., Cohen, M., Sridhara, R., et al. (2005). Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen. *Clin. Cancer Res*, 11, 6414-6421.
- [73] Lu, F.J., Eppler, S.M., Wolf, J., et al. (2006). Clinical pharmacokinetics of erlotinib in patients with solid tumors and exposure-safety relationship in patients with non-small cell lung cancer. *Clin. Pharmacol. Ther*, 80, 136-145.
- [74] Van Erp, N.P., Gelderblom, H., Guchelaar H.J. (2009). Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*, 35, 692-706.
- [75] Marchetti, S., de Vries, N.A., Buckle, T., et al. (2008). Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing *Bcrp1*^{-/-}/*MDR1a/1b*^{-/-} (triple-knockout) and wild-type mice. *Mol. Cancer Ther*, 7, 2280-2287.
- [76] Shi, Z., Peng, X.X., Kim, I.W., et al. (2007). Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res*, 67, 11012-11019.
- [77] Kuang, Y.H., Shen, T., Chen, X., et al. (2010). Lapatinib and erlotinib are potent reversal agents for MRP7 (ABCC10)-mediated multidrug resistance. *Biochem. Pharmacol*, 79(2), 154-161.
- [78] Li, J., Cusatis, G., Brahmer, J., et al. (2007). Association of variant ABCG2 and the pharmacokinetics of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer patients. *Cancer Biol. Ther*, 6(3), 432-438.
- [79] Rudin, C.M., Liu, W., Desai, A., et al. (2008). Pharmacogenomic and pharmacokinetic determinants of erlotinib toxicity. *J. Clin. Oncol*, 26(7), 1119-1127.