

## **SIGNÁLNÍ DRÁHA FANCONIHO ANÉMIE: FUNKCE, TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL, KARCINOM PANKREATU**

T. Hucl, Klinika hepatogastroenterologie IKEM, IV. Interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

Fanconiho anémie (FA) je vzácná recesivní choroba způsobená mutacemi v jednom z genů sdružených do signální dráhy, jejíž funkcí je oprava DNA a udržování neporušeného genomu. K inaktivaci genů signální dráhy FA dochází v řadě lidských nádorů včetně karcinomu pankreatu. Tato inaktivace způsobuje jejich citlivost k látkám poškozujícím DNA. Snaha specificky léčit pankreatické a jiné nádory s FA mutacemi vzbudila v poslední době velký zájem, nicméně preklinické studie byly doposud limitovány nedostatkem vhodných lidských dobře kontrolovatelných buněčných modelů.

Endogenně jsme pomocí knockout techniky přerušili geny *FANCC* a *FANCG* v buněčné adenokarcinomové linii a pozorovali fenotyp typický pro deficit FA signální dráhy (ztráta *FANCD2* monoubiquitinace, chromosomální nestabilita, zástava buněčného cyklu v G2M, snížená proliferace při expozici mitomycinu C, spontánní zlomeniny chromosomů).

Homozygotní přerušení bylo možné pro *FANCC* a *FANCG*, ale ne pro *FANCD2* a *BRCA2* v buněčné linii RKO, což může svědčit pro zhoubný fenotyp při jejich deficitu. Tato skutečnost podporuje paradoxní výklad, že nádorové buňky nepreferují jejich inaktivaci.

Za pomoci vysokokapacitního skríningu jsme posuzovali růst našich isogenních *FANCC* *-/-* a *FANCG* *-/-* buněk po expozici 880 léčivům a 40 000 různorodým chemickým látkám. Látka vykazující největší efekt, nazvaná 80136342, měla odlišný mechanismus účinku než ICL. Když byla podána společně s ICL, měla přinejmenším aditivní efekt, čímž vzniká šance na její použití v kombinaci s ICL.

Pomocí homologní rekombinace jsme nakonec přerušili exon 11 *BRCA2* genu a tím vytvořili první lidský isogenní nádorový buněčný model deficitu *BRCA2*. Pozorovali jsme typický fenotyp (ztráta *RAD51* nukleárních ohnisek, zvýšená chromosomální nestabilita a snížená proliferace při expozici mitomycinu C). Dvě chemoterapeutika, která vyvolala dříve nepotvrzenou hypersensitivitu, mohou být úspěšně použita v klinické praxi (etoposid, NU1025).

Za použití našich *BRCA2* hemizygotních (*wt/Δexon*) buněk jsme zkonstruovali knihovnu syngenních variant exonu 27 (Syngeneic Variance Library, SyVal) pomocí knockin techniky. Funkční analýza zkonstruovaných variant umožnila klasifikaci missense mutací nejasného významu nalezených v nádorových rodinách či posouzení významu některých regulačních částí genu. Techniku jsme aplikovali v klinické praxi a zhodnotili všechny varianty nejasného významu nalezené v České republice v exonu 18 *BRCA2* genu. SyVal tak představuje možnost, jak podrobně anotovat funkci genu pomocí jednoduchých numerických a jednoznačných výsledků.

Na základě našich vlastních zkušeností a podrobného studia literatury jsme souhrnně a podrobně popsali roli signální dráhy Fanconiho anémie a její potenciál v terapii nádorů včetně karcinomu pankreatu, u kterých je tato signální dráha alterovaná. Definovali jsme nový způsob analýzy farmakogenetických dat, představili jsme podrobnou analýzu možností hodnocení variant nejasného významu v *BRCA2* genu.

Hucl T, Rago C, Gallmeier E, Brody JR, Gorospe M, Kern SE. A syngeneic variance library for functional annotation of human variation: application to *BRCA2* exon 27. *Cancer Res* 2008;68: 5023-30.

Hucl T, Gallmeier E, Kern SE. Distinguishing rational from irrational applications of pharmacogenetic synergies from the bench to clinical trials. *Cell Cycle* 2007;6:1336-41.

Hucl T, Gallmeier E, et al. High-throughput Screening Identifies Novel Agents Eliciting Hypersensitivity in Fanconi Pathway-Deficient Cancer Cells. *Cancer Res* 2007;67:2169-77.