

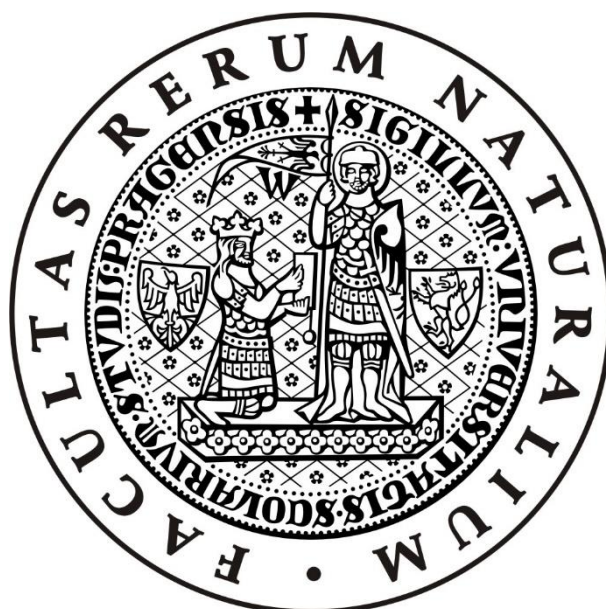
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie**

Studijní program Biologie

Studijní obor Molekulární biologie a biochemie organismů



Shahin Monschizadeh Tehrany

**Mitochondrie jako cíl protinádorových léčiv**  
Mitochondria as a target for anti-cancer therapy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Jaroslav Truksa, Ph.D.

Praha 2015



## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu práce Mgr. Jaroslavu Truksovi, Ph.D. za velkou ochotu, vstřícnost a pomoc při zpracování své bakalářské práce. Možnost působit v tak přátelské atmosféře, jaká panovala v laboratoři nádorové rezistence, mi umožnila velký osobní a profesní rozvoj. Velké poděkování také patří Bc. Lence Holasové za korekturu jazykové stránky a s tím spojenou nadlidskou trpělivost.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....



## **Abstrakt**

Rakovina je komplexní onemocnění vyznačující se velkou heterogenitou ve svých formách a projevech. Tato rozmanitost je zapříčiněna především různými kombinacemi mutací v onkogenech a tumor supresorových genech, jež z nádorů dělají nejasný a nesourodý cíl. Nicméně řada nádorově změněných metabolických drah souvisí s funkcí mitochondrií, které se tak stávají středem zájmu nádorového výzkumu. Mezi tyto změny patří přechod do metabolismu aerobní glykolýzy, jež se vyznačuje zvýšenou spotřebou glukózy, podpořením biosyntetických drah a sníženou oxidační schopností mitochondrií. Další změnou je zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku, jako zdroj nových mutací a faktor podporující buněčnou proliferaci. Vyšší transmembránový potenciál na vnitřní mitochondriální membráně je mimo jiné také velmi častým znakem, který rovněž podporuje buněčné dělení a přímo koreluje se zhoubností nádorů. V této souvislosti byla popsána skupina látek nazývaných mitokany, jež svůj protinádorový účinek směřují na nádorově změněné mitochondrie. Spektrum účinků mitokanů sahá od obnovení vlastnosti proapoptotických molekul po oxidační poškození nádorově změněných mitochondrií a vynucení apoptotické smrti. Tyto látky ukazují svoje protinádorové účinky nejen na buněčných kulturách, ale často i v živých modelech a nabízejí se tak jako slibné modely pro vývoj budoucích protinádorových léčiv.

**Klíčová slova:** mitochondrie, rakovina, protinádorová léčiva, apoptóza

## **Abstract**

Cancer is a complex disease that is characteristic by its heterogeneity in forms and symptoms. This diversity is caused by various mutations in oncogenes and tumor suppressor genes, which then makes cancer a very unclear and indistinct target. However numerous neoplastic characteristics are linked to the functions of mitochondria. This then makes mitochondria a center of interest of cancer research. Many cancer cells show the switch to the metabolism of aerobic glycolysis which is characteristic by the increased glucose uptake, increased activity of biosynthetic pathways and lower oxidative capacity of mitochondria. Another mitochondria-linked modification is the increased production of reactive oxygen species in cancer cells, which are a source of new mutations and enhance cell proliferation. An increased transmembrane potential on the inner mitochondrial membrane is another very common feature that also promotes cell division and directly correlates with cancer malignancy. In this context a group of antitumor drugs called mitocans was discovered, that acts on the altered mitochondria of tumor cells. The activity of mitocans is ranging from the restoration of the function of pro-apoptotic molecules to the enforced cell death caused by oxidative damage done to the mitochondria of cancer cells. These agents are proving their anti-cancer properties not only on cell lines but often also *in vivo*. Mitocans are therefore a promising compounds for future development of anti-cancer drugs.

**Key words:** mitochondria, cancer, anti-cancer drugs, apoptosis

## Seznam zkratek

<b>4-HC</b>	<b>Hydroperoxycyclophosphamide</b>
<b>AIF</b>	<b>apoptosis-inducing factor</b>
<b>Akt</b>	<b>serine-threonine kinase</b>
<b>ALL1</b>	<b>Leukemia, acute lymphocytic, susceptibility to, 1</b>
<b>AML</b>	<b>akutní myeloidní leukémie</b>
<b>ANT</b>	<b>adenin nukleotidový transportér</b>
<b>AP-1</b>	<b>activating protein-1</b>
<b>Apaf-1</b>	<b>apoptotic peptidase activating factor 1</b>
<b>APC</b>	<b>adenomatosis polyposis coli</b>
<b>Ara-C</b>	<b>Cytosine arabinoside</b>
<b>ATP</b>	<b>adenosin trifosfát</b>
<b>Bak</b>	<b>Bcl-2 homologous antagonist/killer</b>
<b>Bax</b>	<b>Bcl-2-associated X protein</b>
<b>Bcl-2</b>	<b>B-cell CLL/lymphoma 2</b>
<b>Bcl-xL</b>	<b>B-cell lymphoma-extra large</b>
<b>Bid</b>	<b>BH3-interacting domain death agonist</b>
<b>Bim</b>	<b>Bcl2-interacting mediator of cell death</b>
<b>BMH</b>	<b>bis-maleimido-hexane</b>
<b>BRCA1</b>	<b>breast cancer 1, early onset</b>
<b>BRCA2</b>	<b>breast cancer 2, early onset</b>
<b>CAD</b>	<b>caspase activated DNase</b>
<b>CAM</b>	<b>cell adhesion molecule</b>
<b>CCL21</b>	<b>chemokine (C-C motif) ligand 21</b>
<b>CP</b>	<b>cytoplasma</b>
<b>CypD</b>	<b>cyclophilin D</b>
<b>DCA</b>	<b>dichloracetát</b>
<b>DISC</b>	<b>death-inducing signaling complex</b>
<b>DR</b>	<b>death receptors</b>
<b>DTDP</b>	<b>dithiodipyridine</b>
<b>EGCG</b>	<b>epigallocatechingallát</b>
<b>EGFR</b>	<b>epidermal growth factor receptor</b>
<b>EndoG</b>	<b>endonukleáza G</b>
<b>ER</b>	<b>endoplasmatické retikulum</b>
<b>ERG1</b>	<b>ETS-related gene-1</b>
<b>ERK</b>	<b>extracellular signal-regulated kinase</b>
<b>ETV1</b>	<b>ETS variant gene 1</b>
<b>ETV6</b>	<b>ets variant 6</b>
<b>EWS</b>	<b>Ewingův sarkom</b>
<b>FADD</b>	<b>Fas-associated death domain protein</b>
<b>FADH2</b>	<b>Redukovaný flavinadenin nukleotid</b>
<b>Fos</b>	<b>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</b>
<b>GPX</b>	<b>Glutathion peroxidázy</b>
<b>HER2/neu</b>	<b>human epidermal growth factor receptor 2</b>
<b>HIFs</b>	<b>hypoxia inducible factors</b>

<b>HKII</b>	<b>hexokináza II</b>
<b>HNPCC</b>	<b>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</b>
<b>HtrA2</b>	<b>high temperature requirement protein A2</b>
<b>CHD</b>	<b>chromodomain helicase DNA-binding</b>
<b>IAP</b>	<b>inhibitors of apoptosis proteins</b>
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	<b>interferon <math>\beta</math></b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Interleukin-1<math>\beta</math></b>
<b>IM</b>	<b>vnitřní mitochondriální membrána</b>
<b>IMS</b>	<b>mitochondriální mezimembránový prostor</b>
<b>INO80</b>	<b>(human) Inositol auxotroph 80</b>
<b>IRF3</b>	<b>Interferon regulatory factor 3</b>
<b>ISWI</b>	<b>Imitation SWI</b>
<b>Jun</b>	<b>JUN proto-oncogene</b>
<b>KIT</b>	<b>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</b>
<b>LDH</b>	<b>laktát dehydrogenáza</b>
<b>LKB1</b>	<b>liver kinase B1</b>
<b>MAMs</b>	<b>mitochondria-associated membranes</b>
<b>MDSC</b>	<b>myeloid-derived suppressor cells</b>
<b>mito</b>	<b>mitochondrie</b>
<b>MitoVES</b>	<b>mitochondrially targeted VE succinate</b>
<b>MLH1</b>	<b>mutL homolog 1</b>
<b>MnSOD</b>	<b>Mn superoxidová dismutáza</b>
<b>MOMP</b>	<b>mitochondrial outer membrane permeabilization</b>
<b>MSH2</b>	<b>mutS homolog 2</b>
<b>MSH6</b>	<b>mutS homolog 6</b>
<b>mtDNA</b>	<b>mitochondriální DNA</b>
<b>MTX</b>	<b>methotrexát</b>
<b>MYC</b>	<b>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</b>
<b>NADH</b>	<b>redukovaný nikotinamidadeninukleotid</b>
<b>NADPH</b>	<b>redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát</b>
<b>Nf2</b>	<b>neurofibromatosis type 2</b>
<b>NFAT1</b>	<b>nuclear factor of activated T lymphocytes</b>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</b>
<b>NK-buňky</b>	<b>přirození zabijedci (natural killer cells)</b>
<b>Noxa</b>	<b>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</b>
<b>OM</b>	<b>vnější mitochondriální membrána</b>
<b>OXPHOS</b>	<b>oxidativní fosforylace</b>
<b>p53</b>	<b>protein 53</b>
<b>PAO</b>	<b>phenylarsine oxide</b>
<b>PDGF</b>	<b>platelet-derived growth factor</b>
<b>PDH</b>	<b>pyruvát dehydrogenáza</b>
<b>PDK</b>	<b>pyruvát dehydrogenáza kináza</b>
<b>PEITC</b>	<b>fenyl ethyl izothiokyanáty</b>
<b>PI3K</b>	<b>fosfoinositid 3-kináza</b>
<b>PI-FeSV</b>	<b>Parodi-Irgens feline sarcoma virus</b>
<b>PKB</b>	<b>protein kinase B</b>

<b>PMM</b>	<b>permeabilizace mitochondriální membrány</b>
<b>pRb</b>	<b>retinoblastoma protein</b>
<b>PT</b>	<b>pyruvátový transportér</b>
<b>PTEN</b>	<b>phosphatase and tensin homolog</b>
<b>PTP</b>	<b>protein tyrosine phosphatases</b>
<b>PTPC</b>	<b>permeability transition pore complex</b>
<b>Puma</b>	<b>p53 upregulated modulator of apoptosis</b>
<b>RAS</b>	<b>rat sarcoma viral oncogene homolog</b>
<b>ROS</b>	<b>reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku</b>
<b>SDH</b>	<b>sukcinát dehydrogenáza</b>
<b>SDHA</b>	<b>A-podjednotka sukcinát dehydrogenázy</b>
<b>SDHB</b>	<b>B-podjednotka sukcinát dehydrogenázy</b>
<b>SDHC</b>	<b>C-podjednotka sukcinát dehydrogenázy</b>
<b>SDHD</b>	<b>D-podjednotka sukcinát dehydrogenázy</b>
<b>Smac/DIABLO</b>	<b>second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with a low isoelectric point</b>
<b>SRC</b>	<b>SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</b>
<b>SSV</b>	<b>simian sarcoma virus</b>
<b>SWI/SNF</b>	<b>SWItch/Sucrose Non-Fermentable</b>
<b>TCA cyklus</b>	<b>trikarboxilový cyklus</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>transforming growth factor <math>\beta</math></b>
<b>TNF</b>	<b>tumor necrosis factor</b>
<b>TPP+</b>	<b>trifenyl fosfoniová skupina</b>
<b>TRAIL</b>	<b>tumor necrosis factor <math>\alpha</math>-related apoptosis inducing ligand</b>
<b>tRNA</b>	<b>transferová RNA</b>
<b>TSC1</b>	<b>tuberous sclerosis 1</b>
<b>TSC2</b>	<b>tuberous sclerosis 2</b>
<b>VC</b>	<b>vinkristin</b>
<b>VDAC</b>	<b>voltage-dependent anion channel</b>
<b>Wnt</b>	<b>wingless-type MMTV integration site family</b>

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Vznik a progrese nádorů.....	1
2.1. Charakteristika nádorových onemocnění.....	1
2.1.1. Nezávislost na růstových faktorech .....	1
2.1.2. Necitlivost k faktorům potlačujícím buněčnou proliferaci .....	2
2.1.3. Zablokování apoptotické smrti.....	2
2.1.4. Neomezený replikační potenciál .....	2
2.1.5. Angiogeneze a krevní zásobení .....	3
2.1.6. Invazivita a schopnost metastázovat .....	3
2.1.7. Genomová nestabilita .....	3
2.1.8. Zánět jako pronádorový faktor .....	3
2.1.9. Změna energetického metabolismu .....	4
2.1.10. Schopnost úniku před imunitními mechanismy .....	4
2.2. Onkogeny .....	5
2.2.1. Transkripční faktory .....	5
2.2.2. Faktory měnící strukturu chromatinu .....	5
2.2.3. Růstové faktory.....	6
2.2.4. Receptory růstových faktorů .....	6
2.2.5. Signální kinázy.....	7
2.2.6. Faktory regulující apoptózu .....	7
2.3. Tumor supresorové geny.....	7
3. Struktura a funkce mitochondrií .....	8
3.1. Struktura mitochondrií.....	8
3.2. Funkce mitochondrií .....	9
3.3. Apoptóza – programovaná buněčná smrt .....	12
3.3.1. Molekulární mechanismy apoptózy .....	12
3.3.2. Vnější cesta apoptózy .....	12
3.3.3. Vnitřní cesta apoptózy.....	13
3.3.4. Kanál PTPC .....	14
4. Mitochondrie jako cíl protinádorových léčiv .....	14
5. Mitokany a jejich klasifikace .....	18
5.1. I. Skupina – inhibitory hexokináz .....	18
5.2. II. skupina – faktory napodobující pro-apoptotické BH3 domény .....	19
5.3. III. skupina – látky modifikující redoxní stav thiolů .....	19

<b>5.4. IV. skupina – látky působící na VDAC/ANT.....</b>	<b>20</b>
<b>5.5. V. skupina – látky působící na elektron transportní řetězec .....</b>	<b>20</b>
<b>5.6. VI. skupina – lipofilní kationty účinkující na vnitřní mitochondriální membránu.....</b>	<b>21</b>
<b>5.7. VII. skupina – látky působící na trikarboxylový cyklus .....</b>	<b>22</b>
<b>5.8. VIII. skupina – látky působící na mtDNA .....</b>	<b>23</b>
<b>6. Závěr – Shrnutí poznatků a potenciální implikace pro protinádorovou léčbu .....</b>	<b>24</b>
<b>7. Přehled použité literatury .....</b>	<b>25</b>

## 1. Úvod

Rakovina je onemocnění, které vzniká na základě různých mutací genomu. Je charakteristické nekontrolovaným buněčným dělením a schopností šířit se do okolních tkání, což často vede k fatálním následkům. V současné době je rakovina jednou z nejčastějších příčin smrti a počet nemocných stále roste. Mezi faktory způsobující rakovinu mimo jiné patří kouření, různé infekční onemocnění, nezdravý životní styl, dědičné faktory a imunitní poruchy. Výskyt rakoviny je také silně závislý na věku: 78 % všech nádorů se vyvíjí u osob starších 55 let (American Cancer Society, 2015). Hlavní překážkou léčby rakoviny je široké spektrum mutací, které ji způsobují. Je proto nepravděpodobné najít efektivní léčbu zaměřením se pouze na jednu metabolickou dráhu. Hledání neměnného cíle v nádorových onemocněních proto představuje možnost obejít jejich velkou diverzitu. Takovýmto cílem mohou být mitochondrie, jejichž funkce je pozměněná ve velkém množství nádorových onemocnění. Odlišnosti ve fyziologii mitochondrií nádorových a zdravých buněk také může sloužit jako základ pro selektivitu na nádorové buňky, což by znamenalo vyšší efektivitu pozdější léčby (Neuzil et al., 2013).

Předložená práce se bude zprvu zaměřovat na charakteristiku nádorových onemocnění a faktory zasluhující se o jejich vznik a rozvoj. V kapitolách 3 a 4 (struktura a funkce mitochondrií a mitochondrie jako cíl protinádorových léčiv) bude následně pojednáváno o struktuře mitochondrií a jejich vztahu k nádorovému bujení. Na základě těchto kapitol pak bude představena skupina látek s protinádorovými účinky působící na mitochondrie – mitokany.

## 2. Vznik a progresse nádorů

### 2.1. Charakteristika nádorových onemocnění

I přes velké množství typů nádorů lze u nich najít určité neměnné vlastnosti. D. Hanahan a R. A. Weinberger navrhli deset základních fyziologických změn, které jsou společné naprosté většině nádorových onemocnění. Tyto změny nejsou pouhým projevem, ale jejich přítomnost přímo zprostředkovává vznik a progresi nádorů (Hanahan, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011). Jsou to: nezávislost na růstových faktorech, necitlivost k faktorům potlačujícím růst, zablokování apoptotické smrti, neomezený replikační potenciál, angiogeneze a krevní zásobení, invazivita a schopnost metastázovat, destabilizace genomu, zánětlivé reakce jako pronádorový faktor, změna energetického metabolismu a únik imunitním mechanismům.

#### 2.1.1. Nezávislost na růstových faktorech

Přítomnost růstové signalizace od jiných buněk nebo tkání je naprosto nezbytná pro zahájení proliferace u zdravých buněk. Těm je mimo jiné umožněna replikace pouze za předpokladu, že jsou zásobovány správnými mitogenními faktory. Tato vlastnost silně kontrastuje s replikační signalizací u nádorových buněk. Pro nádorové buňky je typická snížená závislost na vnějších růstových signálech. Je to dáno tím, že si nádorové buňky tvoří samy růstové faktory, pomocí tzv. autokrinní stimulace. Toto osvobození od vnějších růstových

faktorů narušuje důležité homeostatické mechanismy, které zaručují správné chování buněk uvnitř tkání (Hanahan, 2000; Witsch et al., 2010).

### **2.1.2. Necitlivost k faktorům potlačujícím buněčnou proliferaci**

Ve zdravé tkáni buněčnou homeostázu zprostředkovává škála faktorů zabraňujících buněčnému růstu a dělení. Patří sem jak faktory rozpustné, tak inhibitory růstu zakotvené do cytoplasmatické membrány. Mezi takovéto proteiny patří produkt tumor supresorového genu *Nf2* (neurofibromatosis type 2) - Merlin nebo produkt genu *LKB1* (liver kinase B1) (Hanahan and Weinberg, 2011). Mnoho signálních drah, umožňujících buňkám reagovat na inhibitory růstu, je spojeno s regulací buněčného cyklu, a to především s komponenty řídicími přechod skrz G1 fázi. Naprostá většina těchto signálů pak prochází přes tumor supresorový protein pRb (retinoblastoma protein), který reguluje expresi genů důležitých pro přechod z G1 fáze do S fáze. Narušení pRb dráhy umožňuje buněčnou proliferaci a sníženou citlivost k signálům inhibujícím růst. Tento jev je charakteristický pro naprostou většinu nádorových onemocnění (Hanahan, 2000; Giacinti and Giordano, 2006).

### **2.1.3. Zablokování apoptotické smrti**

Data získaná z buněčných kultur, myších modelů a z biopsií lidských nádorů ukazují, že rezistence k apoptóze je znakem společným pravděpodobně pro většinu typů nádorů. Tato rezistence může být získána mnoha různými mechanismy. Z mutací různých genů, které se účastní regulace komplexního procesu apoptózy, je nejznámější inaktivující mutace v tumor supresorovém genu p53 (Hanahan, 2000). Dalším příkladem může být zvýšená exprese anti-apoptotických onkogenů pro proteiny Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) a Bcl-X<sub>L</sub> (B-cell lymphoma-extra large), popřípadě zvýšená exprese inhibitorů apoptózy IAP (inhibitors of apoptosis proteins) (Modica-Napolitano and Singh, 2004).

### **2.1.4. Neomezený replikační potenciál**

Všechny výše uvedené charakteristiky nádorových buněk vedou k oddělení replikačního programu od vnějších signálů. Samy o sobě však nezaručí expanzivní nádorové bujení, protože za běžných okolností mají všechny savčí buňky omezený počet dělení, kterým mohou projít (Hanahan, 2000). Množství dělení je dáno délkou telomer, ochranných konců chromozomů, které se po každém dělení zkracují. Neustálé zkracování telomer pak vede ke ztrátě jejich ochranné funkce a dochází tak k poškození DNA. To vede k smrti postižené buňky. Proto dochází u zdravých buněk k přechodu do fáze senescence a zastavení replikace. V případě určitých onkogenních mutací dochází k výše zmíněnému „odkrytí“ konců chromozomů a buňky přechází do fáze krize. Ta je charakterizována masivním odumíráním buněk. Občas ale dochází k vytvoření buněčné varianty, která má schopnost neomezeného dělení – stav zvaný imortalizace, nesmrtelnost. Neomezené dělení umožňuje zvýšená exprese telomerázy, enzymu, který prodlužuje telomery. Zvýšení exprese nebo reaktivace telomerázy je společným znakem většiny druhů nádorů (Granger et al., 2002).

### **2.1.5. Angiogeneze a krevní zásobení**

Dostatek kyslíku a živin je nezbytný pro správné fungování a přežití buněk. Během organogeneze je toto zajišťováno tvorbou nových cév – angiogenezí. Je známo, že schopnost indukovat a udržet angiogenezi se aktivuje v pozdější fázi nádorového bujení. Přepnutí do této fáze umožňuje prudkou klonální expanzi spojenou s tvorbou makroskopických nádorů, neboť bez cévního zásobení nejsou nádory schopny dále růst (Hanahan, 2000).

### **2.1.6. Invazivita a schopnost metastázovat**

Dříve nebo později ve vývoji nádoru dochází k odštěpování buněk od primárního nádoru. Ty pak pronikají do okolních tkání, kde mohou založit nový nádor. Tyto nově vzniklé nádory, metastázy, jsou z 90 % příčinou smrti způsobené nádorovým onemocněním. U buněk prokazujících invazivní a metastatické vlastnosti se vyskytuje množství změn v proteinech podílejících se na adhezi buněk. Mezi ovlivněné proteiny patří skupina adhezivních molekul CAM (cell adhesion molecule), především cadheriny a integriny. Druhým obecným rysem invazivních a metastazujících buněk je využití extracelulárních proteáz. Proteázy degradující matrix jsou spojeny s vnějším povrchem buňky pomocí transmembránové domény, navázáním na specifické vazebné receptory proteáz nebo asociací s integriny. Takto navázané proteázy umožňují invazi nádorových buněk do stromatu okolních tkání přes stěny cév a skrz epitelové vrstvy (Hanahan, 2000).

### **2.1.7. Genomová nestabilita**

Rozvoj nádoru velkou měrou závisí na úspěchu mutací v genomu buňky. Jinými slovy určité mutace poskytují rakoviným buňkám výhody, které vyústí v ustálení daného genotypu v nádoru. Za normálních podmínek buňka disponuje řadou mechanismů pro udržování integrity genomu. Zaslужují se o to faktory, které: 1) zjišťují poškození DNA a aktivují opravné mechanismy, 2) přímo opravují poškození genomu a 3) inaktivují mutagenní molekuly. Mutace těchto faktorů vedou k dalším mutacím, které zásobují vznikající nádor novými genotypy, z nichž se nejúspěšnější ustálí (Hanahan and Weinberg, 2011). Například dědičná forma rakoviny tlustého střeva (HNPCC-Hereditary non-polyposis colorectal cancer) je způsobena mutacemi v genech mismatch repair proteinů MLH1 (mutL homolog 1), MSH2 (mutS homolog 2) a MSH6 (mutS homolog 6). Mutace v genech *BRCA1* (breast cancer 1, early onset) a *BRCA2* (breast cancer 2, early onset) vede u 40 % až 80 % pacientů k vývoji dědičných forem rakoviny prsu a vaječníku. *BRCA1* i *BRCA2* kódují geny zasluhující se o opravy homologní rekombinací (Ciccia and Elledge, 2010).

### **2.1.8. Zánět jako pronádorový faktor**

Je známo, že se ve většině nádorů nachází buňky imunitního systému. Jejich koncentrace se pohybuje od množství detekovatelného pouze protilátkami na daný typ buněk až po velké zánětlivé reakce. Navzdory tomu, že jsou zánětlivé procesy obrannou reakcí buňky na nově vznikající nádor, jejich přítomnost se ukazuje být pro nádory prospěšná. Buňkám jsou prostřednictvím těchto fyziologických reakcí dodávány růstové a angiogenní faktory, faktory inhibující buněčnou smrt a enzymy modifikující mezibuněčný prostor pro angiogenezi. Buňky imunitního systému mimo jiné také uvolňují molekuly reaktivních forem kyslíku (ROS –

reactive oxygen species), které svými mutagenními vlastnostmi přispívají k rozvoji nádoru. Zánětlivá odpověď je v některých případech důležitá zejména v raných stádiích nádorové transformace (Hanahan and Weinberg, 2011).

### **2.1.9. Změna energetického metabolismu**

Mezi nejznámější nádorové změny patří tzv. Warburgův efekt. Za aerobních podmínek dochází u normálních diferencovaných buněk během glykolýzy k postupné přeměně glukózy v pyruvát. Ten se pomocí trikarboxylového cyklu a oxidativní fosforylace přeměňuje v oxid uhličitý, vodu a ATP (adenosin trifosfát). Jedná se o velmi efektivní proces, při kterém se na jednu molekulu glukózy vytvoří 38 molekul ATP. Jedině za anaerobních podmínek dochází ke konverzi pyruvátu na laktát. Tento děj je z hlediska produkce ATP velmi nevýhodný, protože se na jednu molekulu glukózy vytvoří pouze 2 molekuly ATP. Německý vědec Otto H. Warburg v roce 1927 objevil, že rakovinné buňky vykazují i za standardní koncentrace kyslíku vyšší hladinu glykolýzy a produkci laktátu- proces zvaný „aerobní glykolýza“ (Warburg, 1925; Kroemer and Pouyssegur, 2008). Warburg předpokládal, že rakovinné buňky mají poškozené mitochondrie, což má za následek narušení aerobní respirace a následnou bioenergetickou závislost na glykolytickém metabolismu. Pozdější výzkumy však ukázaly, že ačkoliv mitochondrie nejsou v mnoha nádorových buňkách hlavním zdrojem ATP, jejich ostatní funkce nejsou narušeny. Možným důvodem je fakt, že proliferující buňky mají požadavky, které přesahují pouhou produkci ATP. K rozdělení buňky na dvě dceřiné je potřeba replikace všech jejích komponent, což představuje vysoké požadavky na tvorbu nukleotidů, aminokyselin a lipidů. Jelikož je glukóza jedním z hlavních buněčných zdrojů uhlíku a redukčních ekvivalentů, není její využití omezeno jen ve prospěch tvorby ATP, ale také k produkci biomasy. Znamená to tedy, že přepnutí metabolismu k aerobní glykolýze není pouhým vedlejším efektem, ale adaptací buňky k vysokým nárokům na tvorbu biomasy (Vander Heiden et al., 2009).

### **2.1.10. Schopnost úniku před imunitními mechanismy**

Lidský imunitní systém mimo jiné umožňuje rozpoznávání a odstranění většiny potenciálních nádorových buněk. Nádory, které se přece jen rozvinuly, proto musely imunitní systémy obejít, nebo potlačit jejich aktivitu (Hanahan and Weinberg, 2011). Pokusy na myších ukázaly, že nádorové buňky z imunodeficitního jedince často nebyly schopny po transplantaci vyvolat nádor u jedince s funkčním imunitním systémem. Naopak nádorové buňky jedince s funkční imunitou vyvolávaly nádor v imunodeficientních i ve zdravých jedincích. Tento jev je vysvětlován tak, že vysoce imunogenní nádorové buňky jsou ve zdravém organismu běžně eliminovány a zanechány jsou pouze varianty se slabou imunogenní aktivitou. Tyto slabě imunogenní formy pak mohou vyvolat nádor v imunodeficitních i ve zdravých jedincích. Nádorové buňky z imunodeficitního jedince ale obsahují silně imunogenní i slabě imunogenní formy. Po jejich transplantaci se tudíž silně imunogenní varianty poprvé setkávají se zdravým imunitním systémem a jsou eliminovány (Shankaran et al., 2001; Smyth et al., 2006). Další možností je uvolňování imunosupresivních faktorů a potlačování tak aktivity cytotoxických T-lymfocytů a NK-buněk (přírození zabijedci – natural killer cells). Mezi takovéto faktory patří

TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) nebo CCL21 (chemokine (C-C motif) ligand 21) (Shields et al., 2010; Hanahan and Weinberg, 2011). Další mechanismus zahrnuje vyvolání zánětlivých procesů, jejichž buňky mohou být aktivně imunosupresivní. Například regulační T-lymfocyty a myeloidní supresorové buňky MDSC (myeloid-derived suppressor cells) mohou potlačovat aktivitu cytotoxických T-lymfocytů (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009).

## **2.2. Onkogeny**

Mezi geny, jejichž mutace přispívají k výše uvedeným vlastnostem a které se vysokou měrou zaslouhují o maligní transformaci, se nazývají onkogeny. Onkogeny kódují proteiny regulující buněčnou proliferaci, apoptózu nebo obojí. Produkty onkogenu mohou být klasifikovány do šesti skupin (Croce, 2008).

### **2.2.1. Transkripční faktory**

Známým onkogenním transkripčním faktorem je MYC (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog), který se podílí na nádorovém bujení v široké škále nádorů. Jeho deregulace je popsána v 70 % lidských nádorových onemocnění (Dang, 2012). Ve zdravých buňkách se mitogenní signalizací spouští jeho exprese, která vede ke zvýšení exprese genů potřebných k proliferaci. V nádorových onemocněních často dochází k jeho deregulaci. Děje se tak mnoha mechanismy, jako jsou genová amplifikace, chromosomální translokace, mutace v jeho regulačních oblastech nebo mutace, které zvýší jeho stabilitu. Pro nádorové buňky, v nichž došlo k výše uvedenému zvýšení jeho funkce, je typické, že jejich proliferace probíhá nezávisle na přítomnosti růstových faktorů. Jeho zvýšená exprese také způsobuje změny ve struktuře chromatinu, biogenezi ribozomů, v metabolických drahách, buněčné adhezi, angiogenezi a apoptóze (Lin et al., 2012). Mnoho transkripčních faktorů potřebuje pro svou funkci interagovat s jinými proteiny. V některých nádorech například dochází k dimerizaci transkripčního proteinu Fos (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) s transkripčním faktorem Jun (JUN proto-oncogene). Dochází tak k tvorbě transkripčního faktoru AP-1 (activating protein-1). Tento proteinový komplex zvyšuje expresi několika genů regulujících buněčné dělení. Dále pak byla popsána jeho vlastnost represe tumor supresorových genů, jako jsou p53, p21 a p16 (Shaulian and Karin, 2001). Chromosomální translokace často aktivují geny transkripčních faktorů, jejichž následná exprese podporuje nádorové bujení. Mezi takovéto geny patří gen *EWS* v Ewingově sarkomu, nebo geny *ERG1* (ETS-related gene-1) a *ETV1* (ETS variant gene 1) v rakovině prostaty (Croce, 2008).

### **2.2.2. Faktory měnící strukturu chromatinu**

Modifikace v míře sbalení chromatinu hraje důležitou roli v kontrole genové exprese, replikace a chromozomových opravách. Obecně existují dva hlavní mechanismy remodelace chromatinu. Prvním je posttranslační modifikace N-terminálních konců histonových podjednotek a druhým je změna pozice nukleozómů. Pozice a intenzita sbalení pak udává transkripční kapacitu. Enzymatické komplexy remodelující chromatin se rozdělují do 4 skupin: SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable), CHD (chromodomain helicase DNA-binding), ISWI (Imitation SWI) a INO80 ((human) Inositol auxotroph 80). Sekvence nádorových genomů ukázala, že změny ve SWI/SNF rodině hrají důležitou roli v mnoha nádorových

onemocněních a že 20 % všech lidských nádorů obsahovalo mutaci v alespoň jedné z komponent SWI/SNF komplexu (Längst and Manelyte, 2015). Dalším příkladem je mutace v genu *ALL1* (Leukemia, acute lymphocytic, susceptibility to, 1) v akutní lymfocytické leukémii a akutní myelogenní leukémii. *ALL1* je součástí velkého multiproteinového komplexu. Tento komplex remodeluje, acetyluje, deacetyluje a metyluje nukleozómy a volné histony. Spojení *ALL1* s některým z normálních buněčných genů vyúsťuje v tvorbu chimérického proteinu, který deregulací homeobox genů přispívá k tvorbě výše uvedených druhů rakoviny (Croce, 2008).

### 2.2.3. Růstové faktory

Je známo, že konstitutivní aktivace genů pro růstové faktory může přispívat k nádorové transformaci (Croce, 2008). Například hladina  $\beta$ -kateninu, proteinového komplexu účastnícího se regulace buněčné adheze a několika signálních drah, je negativně kontrolována fosforylací, která jej označuje pro ubiquitinylaci a následnou proteolytickou degradaci pomocí proteazómu. K fosforylaci dochází prostřednictvím  $\beta$ -katenin degradujícího komplexu, který mimo jiné obsahuje tumor supresorový protein APC (adenomatosis polyposis coli). Naopak sekreční glykoproteiny rodiny Wnt (wingless-type MMTV integration site family) zabraňují degradaci  $\beta$ -kateninu tím, že jejich navázání na receptor spustí řadu dějů, které rozruší strukturu  $\beta$ -katenin degradujícího komplexu. Inaktivující mutace v genu pro APC blokuje degradaci  $\beta$ -kateninu inhibicí jeho fosforylace. To má za následek hromadění  $\beta$ -kateninu v cytoplasmě, jeho translokaci do jádra a následnou aktivaci genů účastnících se buněčné proliferace (Komiya and Habas, 2008; Polakis, 2012). Dalším příkladem je rodina růstových faktorů PDGF (platelet-derived growth factor), které hrají důležitou roli v embryogenezi a hojení ran. V buňkách se vyskytují jako heterodimerní a homodimerní formy jejich A- a B- řetězců. Retroviry SSV (simian sarcoma virus) a PI-FeSV (Parodi-Irgens feline sarcoma virus) transdukuje gen pro B-PDGF jako onkogenní verzi v-sis. Produkt v-sis způsobuje, po jeho expresi a aktivaci příslušných receptorů, nádorovou transformaci buněk (Heldin and Westermark, 1999).

### 2.2.4. Receptory růstových faktorů

Mutace v receptorech růstových faktorů se vyskytuje v mnoha typech rakovinného bujení. V mnoha nádorech se například vyskytuje delece ligand vazebné domény receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR – epidermal growth factor receptor). Jedná se o transmembránový protein s tyrosin kinázovou aktivitou. Tato mutace má za následek konstitutivní aktivaci EGFR receptoru i v případě nepřítomnosti ligandu. Takto aktivovaný receptor fosforyluje tyrosiny ve své vnitrobuněčné doméně a poskytuje tak místa pro interakci s proteiny obsahujícími doménu SRC (SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase) anebo jiné vazebné domény. Tyto interakce deregulují signalizaci ve více metabolických drahách. Mutace v tomto receptoru byla nalezena ve 40 % pokročilých gliomů. Aktivující mutace se vyskytují také například v kinázové doméně signálních receptorů HER2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) a KIT (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog). Ty jsou pak typické pro rakovinu plic, prsu a nádorů trávicího traktu (Arteaga, 2002; Croce, 2008). Dalším příkladem může být receptor pro výše uvedený PDGF.

V některých případech glioblastomu dochází k amplifikaci genu pro  $\alpha$ -receptor PDGF, což vede k zvýšení jeho exprese. V chronické myelomonocytické leukémii dochází ke spojení genu pro  $\beta$ -receptor PDGF k ETS podobnému genu *ETV6* (ets variant 6). Takto vzniklý chimerický protein se projevuje jako konstitutivně aktivní  $\beta$ -receptor (Heldin and Westermark, 1999).

### 2.2.5. Signální kinázy

Navázání ligandu na receptor tyrosin kinázy způsobuje změnu konformace receptoru a autofosforylaci tyrozinů ve vnitrobuněčné části této molekuly. Autofosforylace zvyšuje kinázovou aktivitu receptoru nebo podporuje jeho interakci s doménami cytoplasmatických proteinů, které jsou efekторы a regulátory vnitrobuněčné signalizace. Mnoho onkogenů kóduje členy těchto signálních drah. Tyto proteiny se stávají onkogenními, když nesou aktivující mutace (Croce, 2008). Známým příkladem je PI3K (fosfoinositid 3-kináza). Tento protein tvoří lipidické druhé posly uvnitř buňky a převádí tak signály od receptorových tyrozin kináz a RAS (rat sarcoma viral oncogene homolog) k efektorům, jako je Akt protein kináza a jejím mnohým cílům. V nádorových buňkách se často vyskytuje aktivující mutace PI3K signalizace, která poskytuje buňkám více prostředků pro růst, proliferaci, přežití a migraci (Martin-Berenjeno and Vanhaesebroeck, 2009; Wong et al., 2010). Dalšími proteiny patřícími do této skupiny jsou tyrosin kinázy SRC a BCR-ABL. Jejich zvýšená aktivace je znakem řady nádorů a má za následek zvýšení proliferace, invazivity, angiogeneze a buněčného přežití (Cilloni and Saglio, 2012; Chen et al., 2015).

### 2.2.6. Faktory regulující apoptózu

Jak bylo výše uvedeno, schopnost potlačení apoptózy je jedním ze základních znaků rakovinných buněk. Nádorové buňky mohou získat rezistenci k apoptóze pomocí zvýšení exprese anti-apoptotických proteinů, jako je Bcl-2, nebo snížením exprese pro-apoptotických proteinů, jako je Bax (Elmore, 2007). Zvýšená exprese anti-apoptotického faktoru Bcl-2 je průvodním znakem určitých druhů rakoviny. Například v lidských folikulárních lymfomech dochází k jeho zvýšené expresi pomocí chromosomální translokace (Adams and Cory, 2007). Kromě potlačení apoptózy přispívá zvýšená exprese Bcl-2 a jemu příbuzných proteinů velkou měrou k chemorezistenci postižené buňky. Například měření na 60 různých nádorových typech ukázalo, že míra exprese anti-apoptotického faktoru Bcl- $x_L$  koreluje s rezistencí na většinu chemoterapeutických léčiv (Amundson et al., 2000).

## 2.3. Tumor supresorové geny

Mezi další geny, jejichž deregulace je zásadní pro vznik a progresi nádorů, patří tzv. tumor supresorové geny. Tumor supresorové geny kódují proteiny, které působí jako faktory inhibující progresi nádorů. Kromě toho regulují mnoho buněčných funkcí, jako jsou odpovědi na signály z kontrolních bodů buněčného cyklu, detekce a opravy poškozené DNA, ubikvitinylace a degradace proteinů, mitogenní signalizace, buněčná diferenciace a indukce apoptózy. Velmi často bývají tumor supresorové geny v nádorech deaktivovány. Jelikož jsou tumor supresorové geny recesivní, je potřeba deaktivace obou alel, aby došlo k inhibici jejich účinků. Nejčastěji zasaženým tumor supresorem je gen *TP53* kódující protein p53 (Sherr, 2004). Produkt tohoto genu

je transkripční faktor p53, který je aktivován v mnoha stresových situacích, jako je ozáření, hypoxie, poškození DNA nebo aktivace onkogenů. V reakci na tyto vlivy dochází k aktivaci p53, jenž spouští expresi genů regulujících zastavení proliferace, přechod do senescence, nebo apoptózu (Sherr, 2004; Jones and Thompson, 2009). Jeho mutace se vyskytuje ve více než 50 % lidských nádorů. Mutace v jiných genech, které ovlivňují funkci p53, se vyskytují ve velkém množství, ne-li ve všech nádorech, jež si udržují funkční p53 (Sherr and McCormick, 2002). Mezi další tumor supresorové geny, jejichž deregulace přispívá k nádorovému bujení, patří *Nf2*, *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), *TSC1* (tuberous sclerosis 1), *TSC2* (tuberous sclerosis 2) a *LKB1* (Chalhoub and Baker, 2009; Hanahan and Weinberg, 2011)

### 3. Struktura a funkce mitochondrií

#### 3.1. Struktura mitochondrií

Mitochondrie patří mezi tzv. semiautonomní organely, což znamená, že obsahují vlastní DNA, prostřednictvím které kódují důležité mitochondriální proteiny. Mitochondriální DNA je také místem transkripční a replikační regulace mitochondrií a vyskytuje se ve formě tzv. nukleoidů. Porovnání sekvencí DNA naznačuje, že mitochondrie současných eukaryotních organismů vznikly z prokaryotických buněk, jež byly v průběhu evoluce endocytovány. Současné mitochondrie postrádají většinu genetické informace, která se nacházela v původní, endocytované bakterii a velká část zbývajících genomu se přemístila do jádra hostitelské buňky. V eukaryotních buňkách může mitochondrie zabírat až 20 % vnitřního objemu buňky. Navzdory častému zobrazování jako 0,5 až 1  $\mu\text{m}$  velké, bakteriím podobné útvary jsou mitochondrie velmi dynamické a plastické organely. Často mění svůj tvar, dělí se a zase se spojují. Dochází k tzv. mitochondriální fúzi nebo k mitochondriální fragmentaci. Mitochondrie nejsou statické organely a pohyb uvnitř buňky jim umožňuje jejich asociace s cytoskeletálními mikrotubuly a navázanými molekulárními motory. Ve vysoce polarizovaných buňkách, jako jsou neurony, se mohou mitochondrie takto pohybovat po velké vzdálenosti (až 1 m). V jiných typech buněk mohou být mitochondrie naopak víceméně fixovány v určité oblasti. Jsou to oblasti s vysokými energetickými nároky jako například v buňkách srdeční a příčné pruhované svaloviny, kde se mitochondrie nacházejí mezi myofibrilami. Dalším příkladem fixované mitochondrie může být ve spermatických buňkách, kde těsně přiléhají k bičíku (Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, 2008).

Mitochondriální genom je rozdělen mezi jadernou DNA a mitochondriální DNA. Mitochondriální DNA je dvouvláknová, asi 16,5 kb dlouhá cirkulární molekula DNA. Obsahuje 37 genů kódujících 13 podjednotek komplexů I, III, IV a V elektron transportního řetězce, 2 ribosomální RNA a 22 transferových RNA (Chinnery et al., 2012). Mitochondriální transferové RNA vykazují odlišnosti od tRNA (transferová RNA) obsažených v cytoplasmě. Jsou v průměru kratší než běžné tRNA a často postrádají určité konzervativní nukleotidové sekvence, které hrají důležitou roli v tvorbě terciální struktury tRNA. Studie však ukázaly, že přesto dochází k tvorbě charakteristické terciální struktury ve tvaru „L“, která je pouze méně stabilní (Wakita et al., 1994; Helm et al., 2000; Christian and Spremulli, 2012). Mitochondriální DNA také neobsahuje téměř žádné

nekódující sekvence (Chinnery et al., 2012). Podstatnou vlastností je rovněž změna čtení univerzálního genetického kódu v porovnání se čtením jaderné DNA. Například kodon UGA, který běžně slouží jako stop-kodon, je v mitochondriích zvířat translatován jako tryptofan. Dalším příkladem je kodon AUA, který je místo izoleucinu překládán jako metionin (Christian and Spremulli, 2012). Mitochondrie tedy používají mírně modifikovaný genetický kód v porovnání s klasickým univerzálním genetickým kódem.

Existují tři základní rozdíly mezi mitochondriální DNA a jadernou DNA, které jsou důležité pro pochopení mitochondriálně vázaných chorob. První z nich je fakt, že savčí mitochondriální DNA se v buňkách vyskytuje ve velkém počtu kopií v rozmezí od stovek po tisíce. Množství kopií je také závislé na typu tkáně. Druhým rozdílem je, že mutace v jednotlivých molekulách mtDNA (mitochondriální DNA) nejsou totožné. Tento jev se nazývá heteroplazmie. Znamená to, že je v buňkách rozdílné množství mutantních a původních mtDNA. Po překročení určitého prahu počtu mutací pak dochází k fyziologickým důsledkům. Třetí rozdíl spočívá v tom, že je mtDNA předávána čistě maternálně. Znamená to, že muži nepřenášejí svou mtDNA a nemohou předávat svému potomstvu mitochondriální mutace (Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, 2008).

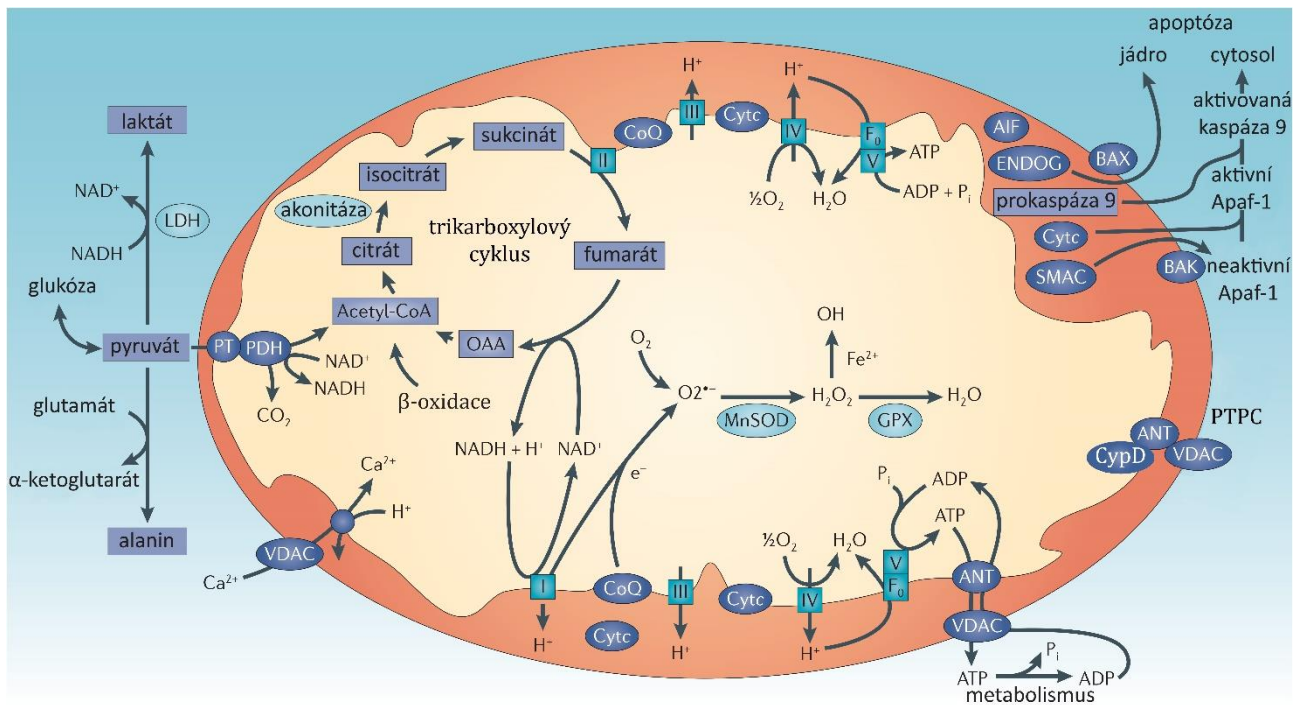
### **3.2. Funkce mitochondrií**

Hlavní funkcí mitochondrií je tvorba energie ve formě ATP. Téměř veškerá energie uvolněná během oxidace cukrů, mastných kyselin a aminokyselin je dostupná uvnitř mitochondrií v podobě redukčních ekvivalentů (-H nebo elektronů). Ty jsou pak transportovány přes proteiny dýchacího řetězce na konečný akceptor  $O_2$ . Tomuto procesu se také říká oxidativní fosforylace. Uvolněná energie je skladována ve formě ATP. Prvním proteinem dýchacího řetězce je NADH-Q-oxidoreduktáza (komplex I), kde jsou elektrony přeneseny z redukčního kofaktoru NADH (redukovaný nikotinamidadeninukleotid) na koenzym Q (ubichinon). Koenzym Q přenáší elektrony na Q-cytochrom c-oxidoreduktázu (komplex III), kterým procházejí na cytochrom c. Pomocí cytochromu c jsou následně elektrony přeneseny na cytochrom c-oxidázu (komplex IV), který ukončuje dýchací řetězec, přenáší elektrony na  $O_2$  a způsobuje jeho redukci na  $H_2O$ .  $FADH_2$  je dalším redukčním kofaktorem. Vzniká během trikarboxylového cyklu přeměnou sukcinátu na fumarát. Elektrony jsou z  $FADH_2$  přeneseny na sukcinát-koenzym Q-reduktázu (komplex II). Odtud jsou přeneseny na koenzym Q a transportovány dál na komplex III. Během pohybu elektronů přes dýchací řetězec dochází k přenosu protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Takto vzniklý protonový gradient pohání enzym ATP-syntázu, který za přítomnosti  $P_i$  a ADP vytváří ATP (Murray et al., 2012).

Kromě tvorby ATP zastávají mitochondrie široké spektrum funkcí. Mitochondrie do cytosolu také dodávají citrát, který slouží jako stavební kámen pro biosyntézu v cytosolu (Chandel, 2014). Dále je pro biosyntetické dráhy dodáván redukční kofaktor NADPH (redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát) a ATP. Při přijetí signálů k růstu je v cytosolu tvořeno velké množství acetyl-CoA z citrátu transportovaného z mitochondrie, což urychluje tvorbu mastných kyselin a sterolů potřebných pro tvorbu nových membrán. Nádorové buňky často mají tuto biosyntetickou dráhu výrazně aktivnější. Cyklus kyseliny močové je další

metabolickou dráhou, jejíž dva důležité kroky probíhají v mitochondriích. Mezi další funkce pak patří biosyntéza hemových skupin a FeS klastrů. I tato biosyntetická dráha se odehrává částečně v mitochondriích (Ajioka et al., 2006). Další důležitou úlohu zastávají mitochondrie při přijímání vápníku z endoplasmatického retikula. Děje se tak přes úseky zvané MAMs (mitochondria-associated membranes). Jsou to úseky mitochondrií, které jsou přilehlé k endoplasmatickému retikulu. Bylo zjištěno, že MAMS jsou nutné k rychlému přenosu iontů vápníku jako signál k regulaci intracelulární hladiny vápníku (Rizzuto et al., 1998). Současné studie také ukazují, že jsou MAMs zodpovědné za regulaci mitochondriálního tvaru a motility, produkci ROS a ATP, autofáгии a imunitní signalizace (van Vliet et al., 2014).

Velmi důležitou roli hrají mitochondrie v intracelulární signalizaci. Nejpatrnějším příkladem je eflux cytochromu c z mitochondrie jako signál a faktor potřebný k zahájení programované buněčné smrti (Liu et al., 1996). Mitochondrie také signalizují prostřednictvím reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS (reactive oxygen species) jsou částečně redukované metabolity atomu kyslíku tvořené hlavně v mitochondriálním elektron transportním řetězci. Patří mezi ně superoxidový anion ( $O_2^- \bullet$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxylový radikál ( $OH \bullet$ ) (Thannickal and Fanburg, 2000). Bylo zjištěno, že nízké hladiny kyslíku vedou ke zvýšené tvorbě ROS. Ty pak mohou mimo jiné aktivovat hypoxií indukované faktory (HIFs- hypoxia inducible factors). HIFs indukují expresi genů potřebných pro adaptaci na hypoxické prostředí (Chandel et al., 1998) (Chandel et al., 2000). Pomocí ROS se mitochondrie také zapojují do regulace odpovědi nespecifické imunity. Například poškození tkáně vede k uvolňování ROS. Tvoří se tak koncentrační gradient směřující akumulaci leukocytů k místu poškození. ROS také aktivují inflamatomy. Jedná se o cytosolický molekulární komplex, který po aktivaci detekuje patogeny a stresové signály a spouští maturaci převážně zánětlivých cytokinů (např. IL-1 $\beta$  – Interleukin-1 $\beta$ ) (Martinon, 2010). Seth a kolektiv objevili také mitochondriální antivirový signalizační protein MAVS. Tento protein zprostředkovává aktivaci antivirových transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) a IRF3 (Interferon regulatory factor 3), které regulují expresi interferonů typu-I jako například interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (Seth et al., 2005).



**Obrázek 1:** Mitochondrie zastávají velké množství funkcí. Jsou křižovatkou řady biosyntetických drah, produkují většinu buněčné ATP, regulují redoxní pochody, generují většinu reaktivních forem kyslíku (ROS), upravují hladinu buněčného  $Ca^{2+}$  a zaslouží se o indukci apoptózy. Možným mechanismem aktivace apoptózy je aktivace PTPC (permeability transition pore complex) póru, který se skládá z kanálu VDAC (voltage-dependent anion channel), ANT (adenin nukleotidový transportér) a CypD (cyclophilin D). Tento komplex může být mimo jiné aktivován zvýšenou tvorbou ROS nebo nadměrnou koncentrací  $Ca^{2+}$ . Další formou aktivace apoptózy je zprůchodnění vnější mitochondriální membrány (MOMP – mitochondrial outer membrane permeabilization). MOMP je umožněno utvořením póru pro-apoptotickými molekulami Bax (Bcl-2-associated X protein) a Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer). Tento pór následně propouští cytochrom-c, který aktivuje Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1), což vede k aktivaci efektorových kaspáz. Společně s cytochromem c jsou do cytosolu vypouštěny i jiné apoptotické proteiny, jako je Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with a low isoelectric point), které inhibují aktivitu anti-apoptotických proteinů. AIF (apoptosis-inducing factor) a EndoG (endonukleáza G) translokují do jádra a štěpí DNA. Energetický metabolismus začíná přeměnou glukózy na pyruvát. Ten je transportován do mitochondrií prostřednictvím pyruvátového transportéru (PT). Na PT je navázán enzym pyruvát dehydrogenáza (PDH), jenž katalyzuje přeměnu pyruvátu na Acetyl koenzym A (Acetyl-CoA), který následně vstupuje do trikárboxylového cyklu (TCA cyklus). Redukční kofaktory (NADH a  $FADH_2$ , vzniklé především během TCA, pak předávají elektrony do elektron transportního řetězce, který pomocí nich produkuje ATP. Změna podmínek metabolismu (např. anaerobní prostředí) vede k akumulaci pyruvátu v cytosolu a k následné tvorbě laktátu za přítomnosti enzymu laktát dehydrogenázy (LDH). Mastné kyseliny jsou pomocí koenzymu A a karnitinu transportovány do mitochondrií, kde vstupují do procesu  $\beta$ -oxidace. Produkty OXPHOS (oxidativní fosforylace) jsou přes vnější mitochondriální membránu transportovány kanálem VDAC. ROS vzniká jako vedlejší produkt OXPHOS, kde se přebytečné elektrony přímo vážou na  $O_2$  a utvoří tak superoxidový aniont  $O_2^{\bullet-}$ . Cytosolický  $O_2^{\bullet-}$  je prostřednictvím Mn superoxidové dismutázy (MnSOD) přeměněn na  $H_2O_2$ , který je pomocí Glutathion peroxidázy (GPX) přeměněn na vodu. V přítomnosti redukovaných kovů může být  $H_2O_2$  přeměněn na velmi reaktivní  $\bullet OH$  radikál (přejato a upraveno z (Wallace, 2012)).

### 3.3. Apoptóza – programovaná buněčná smrt

Růst, vývoj a udržování mnohobuněčného organismu nezávisí jenom na tvorbě nových buněk, ale také na mechanismech, kterým se odstraňují. Například udržování objemu tkání vyžaduje, aby buňky odumíraly stejnou měrou, kterou přibývají. Během ontogenetického vývoje vysoce komplexní mechanismy buněčného odumírání spoluvytváří pozdější tvar končetin a jiných tkání. K odstranění buněk také dochází po jejich nenávratném poškození nebo infekci. Regulovaný proces, který vyústí ve smrt buňky, se nazývá programovaná buněčná smrt neboli apoptóza.

Apoptóza představuje kontrolovaný způsob eliminace buněk, aniž by došlo k ohrožení sousedních buněk nebo tkání. Během tohoto procesu dochází k řadě morfologických změn, jako je smršťování buňky, zhroucení cytoskeletu, rozklad jaderného obalu, kondenzace jaderného chromatinu a jeho následná fragmentace. Častokrát dochází k rozpadu buňky na membránou obklopené fragmenty, takzvaná apoptotická tělíska. Na povrchu apoptotických tělísek se následně objeví signální molekuly, pomocí kterých jsou rozpoznány okolními buňkami nebo makrofágem, a dochází k jejich pohlcení a zneškodnění (Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, 2008).

#### 3.3.1. Molekulární mechanismy apoptózy

Klíčovým mechanismem apoptózy je aktivace kaspáz. Jedná se o cystein-dependentní aspartát specifické proteázy, které štěpí substrát po aspartátu za použití cysteinového postranního řetězce. Podle jejich funkce se dělí na iniciační kaspázy (kaspázy -2, -8, -9, -10), efektorové kaspázy (kaspázy -3, -6, -7) a zánětlivé kaspázy (kaspázy -1, -4, -5). Kaspázy jsou exprimovány ve formě neaktivního enzymu prokaspázy, který se aktivuje katalytickým štěpením (Pop and Salvesen, 2009). Při aktivaci efektorových kaspáz buňka překračuje takzvaný „bod zlomu“ („point of no return“), což znamená, že už není možno apoptózu zastavit a děj se stane nevratným. Proteiny štěpené kaspázami se označují jako „substráty smrti“. Mohou to být komponenty cytoskeletu, proteiny jaderné membrány, buněčné spoje, proteiny zúčastněné v transkripci a translaci, enzymy upravující ribosomální RNA a mnoho jiných. Dalším klíčovým faktorem apoptotické smrti je aktivace DNázy CAD (caspase activated DNase) pomocí kaspáz. CAD je enzym katalyzující štěpení DNA (Taylor et al., 2008).

K aktivaci kaspáz může obecně dojít dvěma hlavními dráhami: vnější apoptotickou dráhou a vnitřní apoptotickou dráhou, i když toto dělení je samozřejmě poněkud schematické.

#### 3.3.2. Vnější cesta apoptózy

Vnější cesta apoptózy je aktivována v reakci na stimulaci transmembránových receptorů z rodiny TNF (tumor necrosis factor) receptorů, také zvaných DR (death receptors), receptory smrti. Nejznámějšími DR jsou: Fas (na který se váže Fas-ligand), TNF receptor-1 (s ligandem TNF- $\alpha$ ) a DR4 a DR5 (s ligandem TRAIL – tumor necrosis factor  $\alpha$ -related apoptosis inducing ligand). Mezi nejznámější a nejlépe prozkoumanou sekvencí dějů, která definuje vnější cestu apoptózy, je aktivace Fas receptoru. Při navázání Fas-ligandu dochází k navázání FADD (Fas-associated death domain protein) adaptorového proteinu (Fas-associated death domain protein), který se váže svojí FADD doménou na korespondující FADD doménu Fas receptoru. Dimerizací

domény smrti FADD adaptorového proteinu a domény smrti prokaspázy-8 dochází k vytvoření komplexu DISC (death-inducing signaling complex). Tento komplex pak spouští autokatalytickou aktivaci prokaspázy-8, která aktivuje efektorové kaspázy (Ashe and Berry, 2003; Elmore, 2007).

### 3.3.3. Vnitřní cesta apoptózy

Vnitřní cesta apoptózy obvykle navazuje na stresové podněty, jako je poškození DNA, virové, nebo bakteriální infekce, oxidační stres, ionizující radiace, chemoterapeutika a mnoho dalších. Dalším faktorem spuštění apoptózy může být absence jistých růstových faktorů, hormonů a cytokinů, která může vést k selhání programů potlačujících apoptózu (Elmore, 2007). Tyto vlivy vedou k zprůchodnění vnější mitochondriální membrány (MOMP). Po tomto kroku následuje uvolnění cytochromu-c z mitochondriálního mezimembránového prostoru do cytosolu. Cytochrom-c funguje za normálních okolností jako přenašeč elektronů mezi komplexem III a komplexem IV elektron transportního řetězce. V případě jeho uvolnění do cytosolu však iniciuje aktivaci kaspáz. V přítomnosti ATP nebo ještě lépe deoxy ATP dochází pomocí cytochromu-c k alosterické aktivaci Apaf-1 (apoptosis-protease activating factor 1). Apaf-1 pak oligomerizuje a utváří tak komplex zvaný apoptozóm. Ten slouží jako adaptorový komplex, který na sebe v těsné blízkosti navazuje 7 molekul prokaspázy-9. Následně dochází k autokatalytickému štěpení prokaspáz-9 a tím k jejich aktivaci. Aktivované kaspázy-9 následně aktivují efektorové kaspázy (Garrido et al., 2006).

Společně s cytochromem-c jsou do cytosolu vypouštěny i jiné apoptotické proteiny, jako jsou Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with a low isoelectric point), HtrA2 (high temperature requirement protein A2), AIF (apoptosis-inducing factor), EndoG (endonukleáza G) a CAD (Caspase activated DNase). Serinové proteázy HtrA2 a Smac/DIABLO potlačují inhibiční aktivitu anti-apoptotických proteinů IAP (inhibitors of apoptosis proteins). AIF a EndoG translokují do jádra, kde štěpením DNA indukují apoptotickou dráhu nezávislou na kaspázách. CAD také translokuje do jádra. Ke štěpení DNA dochází i po translokaci CAD a jeho aktivaci pomocí kaspázy-3 (Elmore, 2007).

Permeabilizaci mitochondriální membrány je umožněna vytvořením póru ve vnější mitochondriální membráně. K tomu dochází působením rodiny Bcl-2 proteinů, které svoji funkci regulují na základě interakce jejich BH domén. Proteiny této rodiny se dělí na dvě skupiny: pro-apoptotické a anti-apoptotické. Členové anti-apoptotické skupiny jsou Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> a Mcl-1. Všechny anti-apoptotické Bcl-2 proteiny obsahují 4 BH domény a jednu transmembránovou doménu, kterou jsou ukotveny do vnější mitochondriální membrány. Jejich anti-apoptotická funkce je dána inhibicí proapoptotických proteinů Bak a Bax. Pro-apoptotické proteiny Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) a Bax (Bcl-2-associated X protein) obsahují kromě transmembránové ještě 3 BH domény. Po jejich aktivaci dochází ke konformačním změnám a k následné oligomerizaci. Tato oligomerizace má za výsledek vytvoření póru ve vnější mitochondriální membráně. Pro-apoptotická skupina dále obsahuje podskupinu tzv. BH3-only proteinů, které obsahují pouze BH3 doménu. Do této podskupiny patří Noxa (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), Puma (p53 upregulated

modulator of apoptosis), Bim (Bcl2-interacting mediator of cell death), Bad (Bcl2 antagonist of cell death), Bid (BH3-interacting domain death agonist). BH3-only proteiny mohou interagovat s anti-apoptotickými Bcl-2 proteiny, uvolňovat je od Bak a Bax a tím zrušit jejich inhibiční aktivitu, nebo mohou přímo aktivovat Bak a Bax a umožnit tak utvoření póru (Chipuk et al., 2010).

#### 3.3.4. Kanál PTPC

Jiným možným způsobem spuštění apoptózy je aktivace PTPC (permeability transition pore complex). PTPC je proteinový komplex, sestavený na místech styku vnitřní a vnější mitochondriální membrány. Mezi hlavní proteiny podílející se na jeho sestavení patří ANT (adenin nukleotidový transportér) na vnitřní mitochondriální membráně, napěťově řízený aniontový kanál VDAC (voltage-dependent anion channel) na vnější mitochondriální membráně a CypD (cyclophilin D) v mitochondriální matrix. Ve zdravých buňkách PTPC kmitá mezi otevřeným a uzavřeným stavem, což umožňuje fyziologickou výměnu malých metabolitů mezi cytolem a mitochondriální matrix. V reakci na řadu signálů, jako je zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS), nebo nadměrná koncentrace  $Ca^{2+}$ , PTPC přechází do stavu zvýšené propustnosti. Tento stav umožňuje nekontrolovaný vstup malých molekul a vody do mitochondriální matrix, následkem čehož dochází k bobtnání mitochondrií (zvětšování objemu mitochondriální matrix). Jelikož je vnitřní membrána díky kristám větší než vnější, dochází vlivem zvětšování objemu mitochondriální matrix k protržení vnější membrány a vypuštění mezimembránových apoptotických faktorů (Zhivotovsky et al., 2009).

## 4. Mitochondrie jako cíl protinádorových léčiv

Rakovinné buňky podstupují mnoho mutací, které v konečném efektu vedou k malignímu fenotypu. Je známo, že určité typy nádorů se vyznačují mutací ve specifických genech. Bylo nicméně zjištěno, že se místa a množství mutací mohou lišit mezi pacienty se stejným druhem nádoru (Parsons et al., 2008; Jones et al., 2012). Heterogenita mezi mutacemi byla prokázána i mezi nádorovými buňkami jednoho pacienta (Gerlinger et al., 2012). Každý buněčný proces se zdá být kontrolován vysoce komplexními mechanismy, a proto mnoho různých mutací může přispět k tvorbě nádoru. Zdá se tedy být velice neúčinné léčit rakovinu zaměřením se pouze na jednu metabolickou dráhu. Výhodnějším přístupem je zaměřit se na znak společný co největšímu množství nádorových buněk. Látka působící selektivně právě na tento znak by pak mohla být schopna účinkovat proti nádorům i v jejich velmi heterogenním kontextu. Takovýmto cílem by mohly být mitochondrie nádorových buněk, které se od mitochondrií normálních buněk liší a umožňují tak vyšší účinek některých látek cílených na mitochondrie v nádorových buňkách – podrobněji je o této problematice pojednáno v kapitole o mitokanech (Biasutto et al., 2010).

Mnoho současných léků svůj účinek směřuje na indukci apoptotické dráhy zahrnující mitochondrie. Takto vzniklý apoptotický stimul pak navazuje na vnitřní dráhu apoptózy. Avšak deregulace některých signalizačních proteinů, jako jsou HIF1, HKII (hexokináza II), c-Myc a P53, vedou k rezistenci nádorových buněk k těmto běžným léčivům a to tak, že změni buněčnou signalizaci a signál k mitochondriální apoptóze není vyslán. Zaměřením se přímo na mitochondrie nabízí možnost obejít problém rezistence, který vzniká výše

uvedenou inaktivací primárních apoptotických signálních molekul a rozšířit tak spektrum léčitelných nádorových onemocnění (Indran et al., 2011).

Mitochondrie hrají důležitou roli v množství bioenergetických, anabolických a apoptotických biochemických drah. Není divu, že mitochondriální dysfunkce významnou měrou přispívají k velikému množství onemocnění, mezi které mimo jiné také patří rakovina. Mnoho běžných znaků nádorových buněk lze přímo či nepřímo přičíst deregulaci mitochondrií (Galluzzi et al., 2010).

Například řada studií poukázala na důležitou roli ROS (reaktivních forem kyslíku) v nádorovém bujení. ROS jsou za fyziologických podmínek tvořeny v mitochondriích, peroxizomech a při zánětlivých procesech. V mnoha typech nádorů je zvýšená hladina ROS. Toto oxidační zatížení následně způsobuje poškození DNA, lipidů a proteinů, což může vést k mutacím a následnému nádorovému bujení. Mnoho protein kináz jako například ERK (extracellular signal-regulated kinase), PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/serine-threonine kinase), PKB (protein kinase B) a PTP (protein tyrosine phosphatases) jsou aktivovány  $H_2O_2$ . Tyto proteiny regulují metabolické dráhy, jako jsou buněčná migrace, proliferace, přežívání buňky a apoptotická signalizace. Jejich konstantní aktivace je tedy možným mechanismem nádorového bujení (Klaunig et al., 2010).

Další výrazným znakem nádorových buněk je zvýšený membránový potenciál na vnitřní mitochondriální membráně, který koreluje se schopností tvořit nádory a se stupněm zhoubnosti nádoru. Bylo ukázáno, že buňky s vyšším transmembránovým potenciálem ochotněji podstupují buněčné dělení a tvorbu nádorů. Přidání inhibitoru transmembránového potenciálu rapamycinu výrazně potlačilo schopnost tvorby nádorů u rakovinných buněk (Schieke et al., 2008; Zhang et al., 2015). Zvýšený membránový potenciál je pak používán pro cílení látek do rakovinných mitochondrií pomocí konjugace s trifenyl fosfoniovou skupinou, jak je uvedeno dále v kapitole o mitokanech.

Nejvíce popsanou nádorovou změnou buněčné fyziologie je jejich přepnutí do metabolismu aerobní glykolýzy. Tento jev je také nazýván Warburgův efekt a je o něm podrobněji pojednáváno v kapitole o charakteristice nádorových onemocnění.

Mimo výše uvedených vlastností je spektrum nádorově změněných fyziologických funkcí a proteinů daleko širší. Tabulka 1 shrnuje některé další důležité rozdíly mezi zdravými a nádorovými mitochondriemi.

**Tabulka 1:** Porovnání fyziologických funkcí a proteinů mitochondrií zdravých a nádorově změněných buněk

Protein/proces	Lokalizace	Fyziologická funkce	Změny v rakovinných buňkách
AIF	IMS	Role v PMM, translokuje do jádra a zprostředkovává degradaci DNA. Potřebný pro složení a udržování komplexu-I	Zvýšená exprese v nádorech žaludku. Snížená exprese je negativní prognózou u AML.

ANT	IM	Součástí PTPC. Umožňuje výměnu adeninových nukleotidů přes IM.	Snížená exprese ANT1 ve vysoce proliferativních nádorech. Zvýšená exprese antiapoptického faktoru ANT2 v mnoha nádorech.
Bak/Bax	CP, OM	Zprostředkovává PMM a apoptózu.	Inaktivováno/ztraceno v mnoha typech nádorů.
Bcl-2/Bcl-X <sub>L</sub>	ER, OM	Blokuje PMM a tím přispívá k rezistenci nádorů k apoptóze.	Zvýšená exprese v mnoha nádorech
proteiny obsahující pouze BH3 doménu	CP, cytoskelet, OM	Vnímá hladinu buněčného stresu a aktivuje apoptotické dráhy.	Inaktivováno/ztraceno v mnoha typech nádorů
CPT1A	OM	Zahazuje mitochondriální import mastných kyselin pro $\beta$ -oxidaci.	Potlačen konstitutivní aktivací PI3K, což přispívá k Warburgově efektu.
Transmembránový potenciál	IM	Důležitý pro syntézu ATP prostřednictvím F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntázy	Nádorové buňky typicky prokazují zvýšený transmembránový potenciál (častokrát spojováno s inhibovanou OXPHOS)
EndoG	IMS	Během PMM translokuje do jádra a zprostředkovává degradaci DNA. Zapojen do oprav DNA.	Změněná exprese v různých typech nádorů.
F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP syntáza	IM	Syntéza ATP poháněna transmembránovým potenciálem. Napomáhá extracelulární acidifikaci a tím podporuje angiogenezi.	Ektopicky exprimována na cytoplasmatické membráně v nádorových buňkách.
Biosyntéza mastných kyselin	CP, mito	Zásobování buňky mastnými kyselinami.	Zesíleno v nádorových buňkách.
HIF-1	jádro	Kontrola transkripce genů účastnících se invazivity, angiogeneze a kontroly metabolismu. Aktivace	Deregulováno různými mechanismy v rozličných typech nádorů.

		vyžaduje ROS a je závislá na komplexu III.	
HK	CP	Katalyzuje první, nevratný krok glykolýzy.	V nádorových buňkách těsně asociovány s VDAC, což přispívá k Warburgově efektu.
hTERT	mito, jádro	Navazuje se na mtDNA a inhibuje PMM	Cytoprotektivní efekt na nádorové buňky při jeho zvýšené expresi.
MAPK	CP, mito, jádro	Zprostředkovává několik růstových signálních kaskád, které vedou k aktivaci transkripčních faktorů.	Regulují procesy nádorového bujení. Udržují necitlivost k faktorům potlačujícím růst.
MnSOD	mito	Spouští senescenci pomocí p21 závislých nebo nezávislých mechanismů	Deaktivováno v různých mechanismy v řadě nádorů.
OXPHOS	IM	Generuje transmembránový potenciál potřebný pro syntézu ATP.	Inhibována v mnoha nádorech. Přispívá k Warburgově efektu.
PDK1	mito	Inhibuje pyruvát dehydrogenázu, což vede k snížení tvorby acetyl-CoA	Zvýšená exprese v nádorových buňkách. Přispívá k Warburgově efektu.
Trikarboxylový cyklus	mito	Produkuje redukční ekvivalenty potřebné pro OXPHOS.	Mutace v sukcinát dehydrogenáze a fumarát hydratáze nepřímo aktivují indukci HIF-1
TIGAR	CP	Regulováno p53. Snižuje produkci ROS.	Snížená exprese v buňkách s inaktivovaným p53.
HSP	CP, mito, jádro	Chaperony, které vykazují cytoprotektivní účinky v reakci na různé nepříznivé podmínky.	Zvýšená exprese v řadě pevných a hematologických nádorů.

Přejato z (Galluzzi et al., 2010)

IMS – mitochondriální mezimembránový prostor, PMM – Permeabilizace mitochondriální membrány, AML – akutní myeloidní leukémie, IM – vnitřní mitochondriální membrána, PTPC – permeability transition pore complex, CP – cytoplasma, OM – vnější mitochondriální membrána, ER – endoplasmatické retikulum, OXPHOS – oxidativní fosforylace, mito – mitochondrie

Jak je vidět, je veliké množství mitochondriálně vázaných změn v nádorových buňkách. Mnohé z nich jsou často společné většímu spektru nádorových onemocnění a nabízejí se tak jako cíl pro výzkum nádorových

léčiv. Látky působící na mitochondrie nádorových buněk jsou nazývány „mitokany“ a jsou dále podrobněji popsány.

## 5. Mitokany a jejich klasifikace

Slovo „mitokan“ vzniklo ze spojení slov „mitochondria“ a „cancer“ (mitochondrie a rakovina). Mitokany jsou skupina látek s protinádorovým účinkem, které se vyznačují společnou vlastností destabilizace mitochondrií. Klasifikují se do osmi skupin. Skupiny jsou určovány podle místa účinku mitokanů, a to od povrchu po mitochondriální matrix (Neuzil et al., 2013). Jednotlivé skupiny a jejich zástupci jsou shrnuty v tabulce 2. Místa účinku jsou uvedeny v obrázku 2.

**Tabulka 2:** Klasifikace a místo účinku jednotlivých skupin mitokanů

Skupina	Místo účinku	Zástupci
I	Inhibice hexokináz	3-Bromopyruvát, 2-deoxyglukóza
II	Napodobení H3 domény apoptotických faktorů	Gossypol, epigallocatechingallát
III	Modifikace redoxních stavů thiolů	PEITC, BMH, DTDP, PAO
IV	Ovlivnění VDAC/ANT	Lonidamid, arsenik, CD437
V	Ovlivnění elektron transportního řetězce	Tamoxifen, $\alpha$ -TOS, MitoVES
VI	Ovlivnění vnitřní mitochondriální membrány lipofilními kationty	Rhodamin-123, F16
VII	Ovlivnění trikarboxylového cyklu	Dichloracetát (DCA)
VIII	Ovlivnění mitochondriální DNA	Vitamin K3, MitoVES, fialuridin

(Neuzil et al., 2007, 2013)

### 5.1. I. Skupina – inhibitory hexokináz

Hexokinázy katalyzují reakci, při které z glukózy vzniká glukóza-6-fosfát za spotřeby ATP. V nádorových buňkách se hexokinázy často nachází asociované s napětově řízeným kanálem VDAC na vnější mitochondriální membráně a adenin nukleotidovým transportérem (ANT) na straně vnitřní. Mnohdy v těchto buňkách dochází k zvýšené expresi kanálu VDAC a hexokinázy (Mathupala et al., 2006). Zvýšené navazování hexokinázy na VDAC zabraňuje navazování pro-apoptického faktoru Bax. To má za následek znemožnění tvorby póru na vnější mitochondriální membráně a zabránění migraci cytochromu c z mitochondrie do cytosolu. Takto je efektivně odvrácena apoptóza (Pastorino et al., 2002; Neuzil et al., 2007).

Z tohoto důvodu byly do této skupiny zařazeny 3-bromopyruvát a 2-deoxyglukóza, které inhibují stabilitu komplexu hexokináza-VDAC. Toto zeslabení pak umožňuje navázání Bax na VDAC a spuštění apoptotické signalizace. 3-bromopyruvát také inhibuje komponentu citrátového cyklu a elektron transportního řetězce – sukcinát dehydrogenázu (SDH) a také mnoho jiných enzymů glykolytické dráhy (Neuzil et al., 2007).

Uvolnění hexokinázy II z komplexu s VDAC bylo také vyvoláno inaktivací cyclophilinu D pomocí malých interferujících RNA, nebo působením cyclophilinového inhibitoru. V tomto případě pak došlo k umožnění vazby Bax na VDAC a ke spuštění apoptózy (Machida et al., 2006).

### **5.2. II. skupina – faktory napodobující pro-apoptotické BH3 domény**

Druhá skupina mitokanů jsou látky napodobující BH3 domény pro-apoptotických faktorů (Neuzil et al., 2007). Tyto látky se vážou na BH3 vazací doménu anti-apoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub>. Těm je pak znemožněno vázat se na Bax a Bak, proapoptotické proteiny, a zabránit tak apoptóze. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bax a Bak patří do tzv. Bcl-2 rodiny proteinů, které hrají klíčovou roli v regulaci apoptózy. Regulace je na úrovni řízení integrity vnější mitochondriální membrány. Proapoptotické vlastnosti Bax a Bak potvrzuje neschopnost permeabilizace vnější mitochondriální membrány po apoptotickém stimulu při jejich absenci (Esposito and Dive, 2003). Aktivní částí proteinu Bax je jeho C-terminální část, která je v latentní fázi rozdělena prolinem 68 na hydrofobní kapsu tvořenou doménami BH1 a BH2 a doménu BH3. Bak má naopak kotevní strukturu, která ho ukotvuje do komplexu s VDAC na vnější mitochondriální membráně. V případě výskytu apoptotického stimulu dojde ke změně konformace Bax a Bak a k jejich oligomerizaci a následnému vytvoření póru, který umožňuje únik apoptotických signálů z mezimembránového prostoru mitochondrie (Armstrong, 2006).

Zvýšená exprese Bcl-2 je průvodním znakem některých nádorových onemocnění (Miyashita and Reed, 1992). Jeho zvýšený výskyt také způsobuje rezistenci k chemoterapeutikům, jako jsou alkylační reagenty (4-HC – Hydroperoxycyclophosphamide), antimetabolity (Ara-C – Cytosine arabinoside), inhibitor syntézy deoxynukleotidů (MTX – methotrexát), inhibitor topoizomeráz (VP-16), inhibitor mikrotubulů VC (vinkristin) nebo cisplatina, která přímo modifikuje DNA a proteiny (Miyashita and Reed, 1993).

Do této skupiny mitokanů náleží látky, jako například polyfenoly gossypol a epigallocatechingallát (EGCG), nebo peptidy založené na sekvenci BH3 domény. Aplikace látek mimikujících BH3 doménu by tak mohla, pravděpodobně v kombinaci s dalšími látkami, být jednou z cest jak čelit nádorové rezistenci (Neuzil et al., 2007).

### **5.3. III. skupina – látky modifikující redoxní stav thiolů**

Členové třetí skupiny mitokanů modifikují redoxní stavy thiolů, což jsou klíčové molekuly regulující permeabilitu mitochondrií. Modifikují také redoxní stavy thiolů nacházejících se v transmembránových kanálech, jako jsou VDAC a ANT. Jak VDAC, tak ANT obsahují dva a více cysteinových zbytků, jejichž modifikace může ovlivňovat jejich funkci (Neuzil et al., 2007). Bylo zjištěno, že určité látky podporující vazbu thiolů a tvorbu S-S můstků, jako jsou diamid, BMH (bis-maleimido-hexane), DTDP (dithiodipyridine) a PAO (phenylarsine oxide), způsobí ANT vázanou aktivaci PTPC. Diamid, BMH, DTDP a PAO způsobují mitochondriální dysfunkci i v buňkách exprimujících Bcl-2. To znamená, že tyto látky mohou ve svých proapoptotických účincích obcházet anti-apoptotickou funkci Bcl-2 (Costantini et al., 2000).

Jinou skupinou látek patřících do III. skupiny jsou izothiokyanáty, především fenyl ethyl izothiokyanáty (PEITC). Tato skupina opět účinkuje na bázi modifikace thiolových skupin tím, že tvoří adukty na thiolových skupinách důležitých redoxních regulátorů. Tato skupina látek efektivně inhibuje glutathionový antioxidační systém a indukuje závažnou akumulaci ROS v nádorově změněných buňkách. Toto zvýšení hladiny ROS vyúsťuje v oxidativní poškození mitochondrií, inaktivaci redox-senzitivních molekul a masivní odumírání buněk (Neuzil et al., 2007). Vysoká selektivita těchto látek pro nádorové buňky je vysvětlována tím, že nádorově změněné buňky již za normálních okolností vykazují zvýšené množství ROS. Další zvýšení jejich hladiny představuje pro nádorové buňky stav, kdy už antioxidační mašinerie není schopná vzniklý oxidační stres zvládat a buňka je nucena podstoupit apoptózu, nebo dokonce nekrózu (Trachootham et al., 2006; Xiao et al., 2006). PEITC se nachází ve velkém množství v jedlých zástupcích brukvovitých rostlin, jako jsou brokolice, řeřicha, zelí atd. Bylo prokázáno, že dieta založená na zvýšeném příjmu PEITC z těchto rostlin aktivně potlačuje proliferaci nádorových buněk lidské rakoviny prostaty, a to jak v buněčných liniích, tak *in vivo* (Xiao et al., 2006). Studie prováděné na myších modelech ukázaly výrazné prodloužení přežití myší léčených PEITC oproti myším bez léčby. Průměrná doba dožití byla u léčených myší o 90 % vyšší (Trachootham et al., 2006).

#### **5.4. IV. skupina – látky působící na VDAC/ANT**

Látky patřící do čtvrté skupiny také ovlivňují funkci ANT kanálu. Na rozdíl od třetí skupiny se ale na ANT přímo vážou a modifikují jeho podjednotkovou strukturu. Do této skupiny patří například lonidamin, arsenik a retinoidní derivát CD437. Tyto látky způsobují změnu konformace kanálu ANT, která má za následek aktivaci PTPC. Tento pór umožní nabobtnání vnitřní mitochondriální membrány, který následně vede k protržení vnější membrány. Jejím protržením dochází k uvolnění apoptotických faktorů do cytoplasmy a následnému spuštění apoptózy. I když lonidamin, arsenik a CD437 vyvolává apoptózu ve více typech buněk, *in vitro*, pre-klinické a klinické testy naznačují, že tyto látky působí s upokojitelnou mírou selektivity také proti určitým druhům nádorům *in vivo*. Například arsenik se používá jako lék při akutní myelomonocytické leukémii (Belzacq et al., 2001).

#### **5.5. V. skupina – látky působící na elektron transportní řetězec**

Pátá skupina mitokanů se skládá z velkého počtu různých látek, které ovlivňují komponenty elektron transportního řetězce. Elektrony vzniklé především v citrátovém cyklu jsou pomocí jejich nosičů (NADH a FADH<sub>2</sub>) přenášeny na membránově vázané komplexy I a komplexy II. Z těch jsou potom pomocí ubichinonu transportovány na komplex III a následně za pomoci cytochromu c na komplex IV. Finálním akceptorem elektronů je kyslík, který pak za pomoci vodíků tvoří vodu. Elektron transportní řetězec je díky velkému průtoku elektronů také hlavním zdrojem mitochondriálních ROS. Jak již bylo uvedeno výše, je možno právě tyto ROS využít na selektivní indukci apoptózy (Neuzil et al., 2013).

Do této skupiny patří například tamoxifen. Tato látka prokazuje vlastnost indukce apoptózy v buňkách rakoviny prsu. Dosahuje toho mimo jiné ovlivněním komplexu I elektron transportního řetězce, po kterém pak

dochází k produkci  $H_2O_2$ , které jako ROS vede k poškození buňky a k následné neodvratné apoptóze (Moreira et al., 2006; Neuzil et al., 2007).

Další látkou je analog vitamínu E  $\alpha$ -tokoferyl sukcinát ( $\alpha$ -TOS) (Neuzil et al., 2007).  $\alpha$ -TOS působí na elektron transportní komplex II. Tento komplex má sukcinát dehydrogenásovou aktivitu. Skládá se ze čtyř podjednotek. Zatímco se katalytická podjednotka SDHA (A-podjednotka sukcinát dehydrogenázy) a podjednotka SDHB (B-podjednotka sukcinát dehydrogenázy), obsahující Fe-S klastry, nacházejí v mitochondriální matrix, podjednotka SDHC (C-podjednotka sukcinát dehydrogenázy) a podjednotka SDHD (D-podjednotka sukcinát dehydrogenázy) se nacházejí ve vnitřní mitochondriální membráně (Dong et al., 2009; Grimm, 2013).  $\alpha$ -TOS se váže na ubichinon vazebné místo komplexu II. To znemožní navázání ubichinonu, což vede k zesílenému slučování elektronů a kyslíku za tvorby ROS (superoxidových radikálů). Zvýšení koncentrace ROS pak vede k destabilizaci vnější mitochondriální membrány a následné apoptóze.  $\alpha$ -TOS se ukázalo jako velmi selektivní protinádorová látka. Výhodou je také nízká pravděpodobnost mutace v genech kódujících komplex II, která vede k poklesu účinnosti  $\alpha$ -TOS (Dong et al., 2009).

Účinek analogu vitamínu E ( $\alpha$ -TOS) byl zesílen připojením trifenyl fosfoniové ( $TPP^+$ ) skupiny, která ho díky rozdílnému transmembránovému potenciálu směřuje výhradně do mitochondrií, což je známý princip (Murphy, 2008; Neuzil et al., 2013). Výsledná látka, MitoVES (mitochondrially targeted VE succinate), se ukázala být daleko účinnější než pouhý  $\alpha$ -TOS. Pokusy na myších modelech s HER2 - overexprimující rakovinou prsu a s buňkami rakoviny tlustého střeva ukázaly vysoké protinádorové účinky této látky, které jsou řádově účinnější než  $\alpha$ -TOS (Neuzil et al., 2013).

### **5.6. VI. skupina – lipofilní kationty účinkující na vnitřní mitochondriální membránu**

Šestá skupina mitokanů zahrnuje molekuly obsahující lipofilní delokalizované kationty, jako je  $TPP^+$  (Triphenyl phosphonium). Tyto molekuly akumulují v daleko větší koncentraci v mitochondriální matrix, než v cytoplasmě (Smith et al., 2003; Neuzil et al., 2013). Toto je dáno velkým membránovým potenciálem na mitochondriální membráně, který pro lipofilní kationty tvoří hnací sílu směrem do matrix. V ještě větší míře jsou tyto látky přijímány nádorovými buňkami, které díky pozměněnému bioenergetickému hospodaření tvoří větší membránový potenciál (Modica-Napolitano and Aprille, 1987, 2001).

Příkladem této skupiny látek může být rhodamin- 123, u kterého byla v 80. letech popsána vlastnost selektivní cytotoxicity vůči nádorovým buňkám (Lampidis et al., 1983). Základem toxicity je inhibice  $F_0F_1$ -ATPázy. Díky zvýšenému příjmu této látky pomocí většího membránového potenciálu nádorových buněk dochází k cílené apoptóze (Modica-Napolitano and Aprille, 1987).

Další látkou patřící do této skupiny je molekula nazývána F16. Ukázala se být velmi selektivní a účinná proti nádorům prsu. F16 způsobuje dysfunkci v mitochondriích pomalým rozptýlením protonového gradientu vytvořeného na vnitřní mitochondriální membráně. Takto způsobený pokles v membránovém potenciálu vede k otevření kanálu PTPC (permeability transition pore complex) (Fantin et al., 2002). PTPC je neselektivní

kanál vnitřní mitochondriální membrány, který může být mimo jiné regulován změnami v transmembránovém potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně (Vianello et al., 2012). V jeho otevřené konformaci je propustný pro molekuly do 1500 Da. Otevření tohoto kanálu vede k zvýšené permeabilitě pro malé molekuly a ztrátě iontových gradientů, bobtnání mitochondriální matrix, inhibice respirace, přerušení redoxní homeostázy a uvolnění proapoptogenních faktorů (Fantin et al., 2002).

### **5.7. VII. skupina – látky působící na trikarboxylový cyklus**

Mitokany sedmé skupiny jsou charakteristické svým působením na trikarboxylový neboli Krebsův cyklus a na reakci konvertující pyruvát na acetyl koenzym A. Pyruvát dehydrogenáza, která katalyzuje tuto reakci, je regulována fosforylací pomocí enzymu PDK (pyruvát dehydrogenáza kináza). Inhibice PDK má za následek zvýšení aktivity pyruvát dehydrogenázy, a tudíž i trikarboxylového cyklu. Do této regulace zasahuje jeden z nejvýznamnějších zástupců sedmé skupiny mitokanů, DCA (dichloracetát) (Neuzil et al., 2013). Tato látka je již dobře známá jako inhibitor PDK. Touto přeměnou z glykolytického metabolismu nádorových buněk na oxidační metabolismus v mitochondriích způsobuje tvorbu většího množství NADH, donoru elektronů pro komplex I elektron transportního řetězce. To následně vede k zvýšené produkci ROS. Komplex I je ze všech elektron transportních komplexů nejnáchylnější k poškození pomocí ROS. Je to kvůli tomu, že je největší a má alespoň devět ROS-senzitivních Fe-S-center. Dále má sedm podjednotek kódovaných mitochondriální DNA, které jsou velmi náchylné k oxidativnímu poškození. Takto vzniklá poškození vedou k snížení efluxu vodíků, což vede ke snížení membránového potenciálu mitochondrií. Snížení membránového potenciálu má za následek otevření napěťově řízeného kanálu PTPC (permeability transition pore complex), který umožní vypuštění proapoptotických signálů (Bonnet et al., 2007).

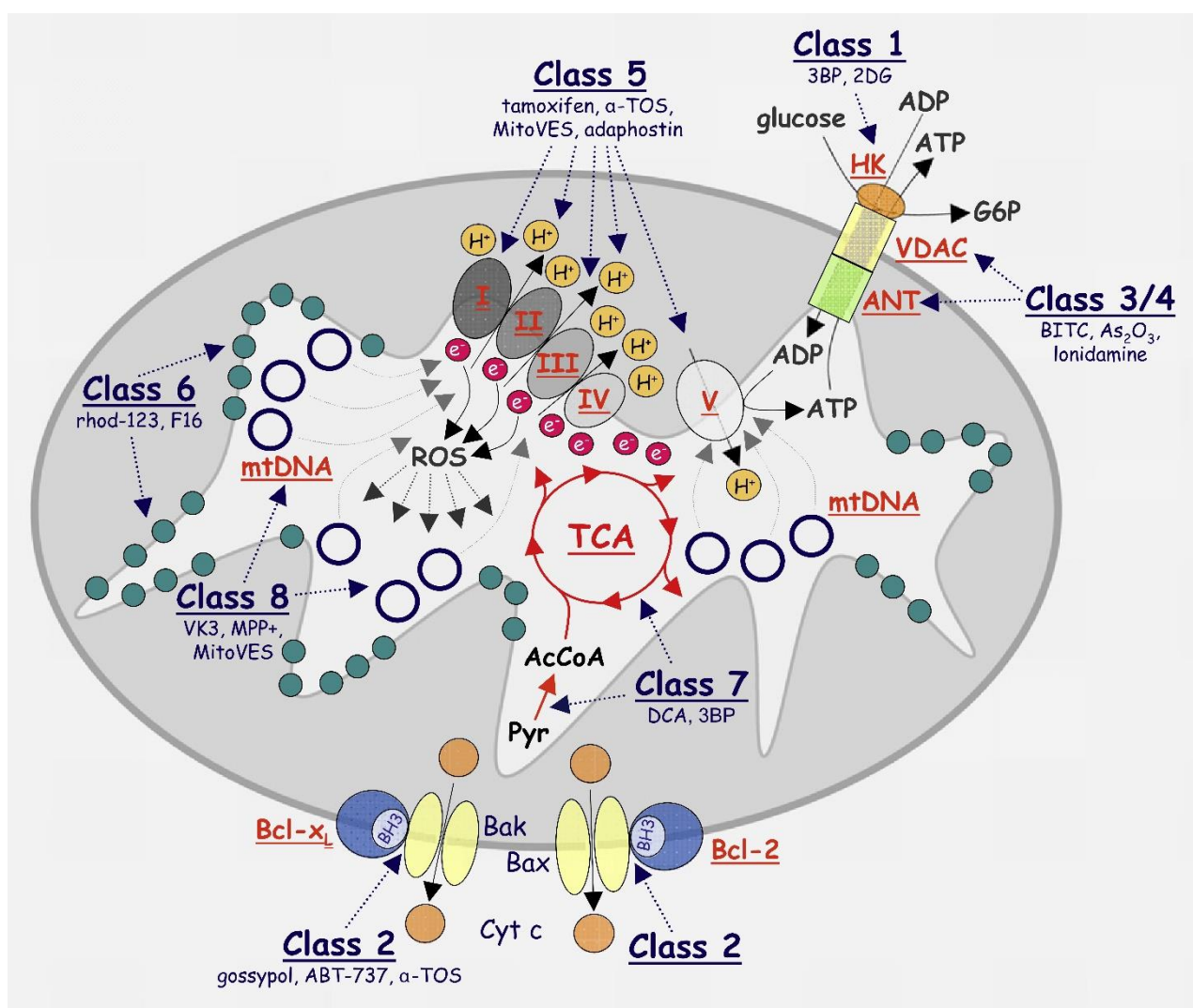
Další častou společnou vlastností nádorových buněk je nízká exprese, nebo inhibice draslíkových kanálů, která má za následek zvýšení intracelulární koncentrace draslíku. Vyšší intracelulární koncentrace draslíku jsou schopny inhibovat aktivitu kaspáz. DCA účinkuje na této úrovni tím, že zvyšuje expresi draslíkových kanálů inhibicí NFAT1 (nuclear factor of activated T lymphocytes). NFAT1 je transkripční faktor regulující buněčnou diferenciaci v mnoha typech buněk, který je citlivý na hladinu vápníku. Vytvořením nových draslíkových kanálů dochází k snížení intracelulární koncentrace draslíku a rušení jeho inhibičního efektu na kaspázy (Bonnet et al., 2007).

I DCA se ukázal být velmi selektivní proti nádorovým buňkám. Například ke zvýšení množství draslíkových kanálů došlo pouze u buněčných linií nádorových buněk. *In vivo* pokusy na laboratorních potkanech ukázaly markantní zmenšení ve velikosti nádorů ve skupině, které byl podáván DCA. Zmenšení korelovalo s mírou indukované apoptózy. Výsledky krevních testů ukázaly, že léčba pomocí DCA neměla toxické vedlejší efekty (Bonnet et al., 2007).

## 5.8. VIII. skupina – látky působící na mtDNA

Osmá skupina se skládá z látek působících na mitochondriální DNA. Další cíl těchto látek může být i mitochondriální DNA polymeráza  $\gamma$ . DNA polymerázy jsou nepostradatelné enzymy pro udržení integrity genomu. To zajišťují jak replikací, tak opravnými aktivitami. Z 16 savčích polymeráz je 15 zodpovědných za udržování jaderného genomu. Replikace a udržování mitochondriálního genomu zajišťuje specificky DNA polymeráza  $\gamma$ . Menandion (VK3), syntetický analog vitamínu K, se mimo tvorbu ROS vyznačuje i inhibicí DNA polymerázy  $\gamma$ . Jelikož má DNA polymeráza  $\gamma$  pro mitochondrie nenahraditelnou roli, její inhibice má za následek akumulaci poškození mitochondriální DNA. To společně s produkcí většího množství ROS vede k indukci buněčné smrti (Sasaki et al., 2008; Loor et al., 2010).

Do této skupiny látek také patří již dříve zmiňovaný MitoVES, který kromě jeho účinků na trikarboxylový řetězec potlačuje transkripci a replikaci mitochondriální DNA a řadí se tak i do VIII. skupiny. Tento účinek doprovází inhibice proliferace nádorových buněk (Neuzil et al., 2013; Truksa et al., 2015).



**Obrázek 2:** Schematická ilustrace míst účinku jednotlivých skupin mitokanů. Skupina I. – inhibitory hexokináza; skupina II – faktory napodobující pro-apoptotické BH3 domény; III. Skupina – látky modifikující redoxní stav thiolů; IV. Skupina – látky působící na VDAC/ANT; V. skupina – látky působící na elektron transportní řetězec; VI. Skupina –

lipofilní kationty účinkující na vnitřní mitochondriální membránu; VII. Skupina – látky působící na trikarboxylový cyklus; VIII. Skupina – látky působící na mtDNA (přejato z (Neuzil et al., 2013))

## **6. Závěr – Shrnutí poznatků a potenciální implikace pro protinádorovou léčbu**

Mitochondrie představují křižovatku řady důležitých metabolických drah a zaujímají tak strategickou pozici v regulaci mnoha buněčných pochodů. Nádorové onemocnění sdílí široké spektrum molekulárních nebo metabolických změn, které jsou s mitochondriemi přímo, nebo nepřímo spojené. Rozdíly ve funkci mitochondrií zdravých a nádorových buněk nabízejí unikátní potenciál pro vývoj protinádorových léčiv, která by mohla selektivně hubit rakovinné buňky. Poslední desetiletí přineslo mnoho takovýchto látek s prokazatelnými protinádorovými účinky (Galluzzi et al., 2010). Mimořádný potenciál mitochondrií jako cíle protinádorových léčiv je umocňován zjištěním, že se mutace způsobující nádorové bujení mohou lišit i mezi buňkami jednoho pacienta. Na základě těchto úvah byla definována skupina protinádorových léčiv směřována výhradně na mitochondrie – mitokany. Tato skupina v mnoha případech prokazuje selektivitu proti nádorovým buňkám, což je jedním z předpokladů pro jejich pozdější využití jako léčiv.

U několika mitokanů došlo i k jejich klinickému použití. Jedním z těchto příkladů je tamoxifen, který je jedním z nejvíce používaných léčiv na rakovinu prsu, přičemž část jeho účinku může být přičtena právě jeho účinku na mitochondrie, přestože klasickým mechanismem účinku je inhibice estrogenní signalizace. Mitokan  $\alpha$ -TOS byl testován na pacientu s mesotheliomovým nádorem.  $\alpha$ -TOS byl podáván v podobě masti. Jeho denní podávání vedlo k tlumení bolesti a ke zmenšení nádoru. Nádor ale začal po čase zase růst a pacient zesnul. Navzdory fatálnímu konci byl život pacienta prodloužen o několik let, výrazně déle než bylo předpokládáno (Neuzil et al., 2013).

I když je zřejmé, že je třeba dalšího bádání, je jasné, že se mitokany nabízejí jako slibná budoucí protinádorová léčiva. Je velice pravděpodobné, že pečlivě promyšlené klinické testy s vybranými mitokany nás posunou blíže k novým, efektivnějším protinádorovým léčivům.

## 7. Přehled použité literatury

- Adams JM, Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324–1337.
- Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. 2006. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1763:723–736.
- Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition.
- American Cancer Society. 2015. *Cancer Facts & Figures 2015*. Cancer Facts Fig.
- Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace J. 2000. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 60:6101–6110.
- Armstrong JS. 2006. Mitochondria: a target for cancer therapy. *Br J Pharmacol* 147:239–248.
- Arteaga CL. 2002. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 7 Suppl 4:31–39.
- Ashe PC, Berry MD. 2003. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:199–214.
- Belzacq AS, El Hamel C, Vieira HL, Cohen I, Haouzi D, Métivier D, Marchetti P, Brenner C, Kroemer G. 2001. Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437. *Oncogene* 20:7579–7587.
- Biasutto L, Dong LF, Zoratti M, Neuzil J. 2010. Mitochondrially targeted anti-cancer agents. *Mitochondrion* 10:670–681.
- Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED. 2007. A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell* 11:37–51.
- Ciccia A, Elledge SJ. 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol Cell* 40:179–204.
- Cilloni D, Saglio G. 2012. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res* 18:930–937.
- Costantini P, Belzacq AS, Vieira HL, Larochette N, de Pablo MA, Zamzami N, Susin SA, Brenner C, Kroemer G. 2000. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene* 19:307–314.
- Croce CM. 2008. *Oncogenes and Cancer*. *N Engl J Med*.
- Dang C V. 2012. MYC on the path to cancer. *Cell* 149:22–35.
- Dong L-F, Freeman R, Liu J, Zabalova R, Marin-Hernandez A, Stantic M, Rohlena J, Valis K, Rodriguez-Enriquez S, Butcher B, Goodwin J, Brunk UT, Witting PK, Moreno-Sanchez R, Scheffler IE, Ralph SJ,

- Neuzil J. 2009. Suppression of tumor growth in vivo by the mitocan alpha-tocopheryl succinate requires respiratory complex II. *Clin Cancer Res* 15:1593–1600.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495–516.
- Esposti MD, Dive C. 2003. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 304:455–461.
- Fantin VR, Berardi MJ, Scorrano L, Korsmeyer SJ, Leder P. 2002. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell* 2:29–42.
- Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Rigoni A, Vacchelli E, Michaud M, Zischka H, Castedo M, Kroemer G. 2010. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med* 31:1–20.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13:1423–1433.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. 2012. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* 366:883–892.
- Giacinti C, Giordano A. 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25:5220–5227.
- Granger MP, Wright WE, Shay JW. 2002. Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol* 41:29–40.
- Grimm S. 2013. Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1827:565–72.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674.
- Hanahan D. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57–70.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029–1033.
- Heldin CH, Westermark B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:1283–1316.
- Helm M, Brulé H, Friede D, Giegé R, Pütz D, Florentz C. 2000. Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA* 6:1356–1379.
- Chalhoub N, Baker SJ. 2009. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 4:127–150.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11715–11720.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez J a., Rodriguez a. M, Schumacker PT. 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: A mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem* 275:25130–25138.

- Chandel NS. 2014. Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol* 12:34.
- Chen Q, Zhou Z, Shan L, Zeng H, Hua Y, Cai Z. 2015. The importance of Src signaling in sarcoma. *Oncol Lett* 10:17–22.
- Chinnery PF, Elliott HR, Hudson G, Samuels DC, Relton CL. 2012. Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol* 41:177–187.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. 2010. The BCL-2 Family Reunion. *Mol Cell* 37:299–310.
- Christian BE, Spremulli LL. 2012. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1819:1035–1054.
- Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1807:735–745.
- Jones DTW, Jäger N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, Cho Y-J, Pugh TJ, Hovestadt V, Stütz AM, Rausch T, Warnatz H-J, Ryzhova M, Bender S, Sturm D, Pleier S, Cin H, Pfaff E, Sieber L, Wittmann A, Remke M, Witt H, Hutter S, Tzaridis T, Weischenfeldt J, Raeder B, Avci M, Amstislavskiy V, Zapatka M, Weber UD, Wang Q, Lasitschka B, Bartholomae CC, Schmidt M, von Kalle C, Ast V, Lawerenz C, Eils J, Kabbe R, Benes V, van Sluis P, Koster J, Volckmann R, Shih D, Betts MJ, Russell RB, Coco S, Paolo Tonini G, Schüller U, Hans V, Graf N, Kim Y-J, Monoranu C, Roggendorf W, Unterberg A, Herold-Mende C, Milde T, Kulozik AE, von Deimling A, Witt O, Maass E, Rössler J, Ebinger M, Schuhmann MU, Frühwald MC, Hasselblatt M, Jabado N, Rutkowski S, von Bueren AO, Williamson D, Clifford SC, McCabe MG, Peter Collins V, Wolf S, Wiemann S, Lehrach H, Brors B, Scheurlen W, Felsberg J, Reifenberger G, Northcott PA, Taylor MD, Meyerson M, Pomeroy SL, Yaspo M-L, Korbel JO, Korshunov A, Eils R, Pfister SM, Lichter P. 2012. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature* 488:100–105.
- Jones RG, Thompson CB. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23:537–548.
- Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. 2010. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 38:96–109.
- Komiya Y, Habas R. 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4:68–75.
- Kroemer G, Pouyssegur J. 2008. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* 13:472–482.
- Lampidis T, Bernal S, Summerhayes I, Chen L. 1983. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 43:716–720.
- Längst G, Manelyte L. 2015. Chromatin Remodelers: From Function to Dysfunction. *Genes (Basel)* [Internet] 6:299–324. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4425/6/2/299/>
- Lin CY, Lovén J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA. 2012. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 151:56–67.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147–157.

- Loor G, Kondapalli J, Schriewer JM, Chandel NS, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. 2010. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic Biol Med* 49:1925–1936.
- Machida K, Ohta Y, Osada H. 2006. Suppression of apoptosis by cyclophilin D via stabilization of hexokinase II mitochondrial binding in cancer cells. *J Biol Chem* 281:14314–14320.
- Martin-Berenjeno I, Vanhaesebroeck B. 2009. PI3K Regulatory Subunits Lose Control in Cancer. *Cancer Cell* 16:449–450.
- Martinon F. 2010. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol* 40:616–619.
- Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. 2006. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* 25:4777–4786.
- Miyashita T, Reed JC. 1992. bcl-2 Gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 52:5407–5411.
- Miyashita T, Reed JC. 1993. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81:151–157.
- Modica-Napolitano JS, Aprille JR. 1987. Basis for the selective cytotoxicity of rhodamine 123. *Cancer Res* 47:4361–4365.
- Modica-Napolitano JS, Aprille JR. 2001. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Adv Drug Deliv Rev* 49:63–70.
- Modica-Napolitano JS, Singh KK. 2004. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* 4:755–762.
- Moreira PI, Custódio J, Moreno A, Oliveira CR, Santos MS. 2006. Tamoxifen and estradiol interact with the flavin mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure. *J Biol Chem* 281:10143–10152.
- Murphy MP. 2008. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. In: *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*. . p 575–587.
- Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 28th ed. Praha: Galén, spol. s r.o.
- Neuzil J, Dong LF, Ramanathapuram L, Hahn T, Chladova M, Wang XF, Zobalova R, Prochazka L, Gold M, Freeman R, Turanek J, Akporiaye ET, Dyason JC, Ralph SJ. 2007. Vitamin E analogues as a novel group of mitocans: Anti-cancer agents that act by targeting mitochondria. *Mol Aspects Med* 28:607–645.
- Neuzil J, Dong LF, Rohlena J, Truksa J, Ralph SJ. 2013. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion* 13:199–208.
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. 2009. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182:4499–4506.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I-M, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz

- LA, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807–1812.
- Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. 2002. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 277:7610–7618.
- Polakis P. 2012. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:9.
- Pop C, Salvesen GS. 2009. Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284:21777–21781.
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* 280:1763–1766.
- Sasaki R, Suzuki Y, Yonezawa Y, Ota Y, Okamoto Y, Demizu Y, Huang P, Yoshida H, Sugimura K, Mizushima Y. 2008. DNA polymerase  $\gamma$  inhibition by vitamin K3 induces mitochondria-mediated cytotoxicity in human cancer cells. *Cancer Sci* 99:1040–1048.
- Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. 2005. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell* 122:669–682.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107–1111.
- Shaulian E, Karin M. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20:2390–2400.
- Sherr CJ, McCormick F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2:103–112.
- Sherr CJ. 2004. Principles of Tumor Suppression. *Cell* 116:235–246.
- Shields JD, Kourtis IC, Tomei AA, Roberts JM, Swartz MA. 2010. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 328:749–752.
- Schieke SM, Ma M, Cao L, McCoy JP, Liu C, Hensel NF, Barrett AJ, Boehm M, Finkel T. 2008. Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 283:28506–28512.
- Smith RAJ, Porteous CM, Gane AM, Murphy MP. 2003. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5407–5412.
- Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. 2006. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. *Adv Immunol* 90:1–50.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231–241.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1005–L1028.

- Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, Chiao PJ, Achanta G, Arlinghaus RB, Liu J, Huang P. 2006. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by  $\beta$ -phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 10:241–252.
- Truksa J, Dong L-F, Rohlena J, Stursa J, Vondrusova M, Goodwin J, Nguyen M, Kluckova K, Rychtarcikova Z, Lettlova S, Spacilova J, Stapelberg M, Zoratti M, Neuzil J. 2015. Mitochondrially targeted vitamin e succinate modulates expression of mitochondrial DNA transcripts and mitochondrial biogenesis. *Antioxid Redox Signal* 22:883–900.
- Vianello A, Casolo V, Petrusa E, Peresson C, Patui S, Bertolini A, Passamonti S, Braidot E, Zancani M. 2012. The mitochondrial permeability transition pore (PTP) - An example of multiple molecular exaptation? *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1817:2072–2086.
- Van Vliet AR, Verfaillie T, Agostinis P. 2014. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1843:2253–2262.
- Wakita K, Watanabe Y, Yokogawa T, Kumazawa Y, Nakamura S, Ueda T, Watanabe K, Nishikawa K. 1994. Higher-order structure of bovine mitochondrial tRNAPhe lacking the ' conserved ' GG and TICG sequences as inferred by enzymatic and chemical probing. *22:347–353*.
- Wallace DC. 2012. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 12:685–698.
- Warburg O. 1925. The Metabolism of Carcinoma Cells. *J Cancer Res* 9:148–163.
- Witsch E, Sela M, Yarden Y. 2010. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 25:85–101.
- Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. 2010. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 20:87–90.
- Xiao D, Lew KL, Zeng Y, Xiao H, Marynowski SW, Dhir R, Singh S V. 2006. Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by reactive oxygen species-dependent disruption of the mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis* 27:2223–2234.
- Zhang B, Wang D, Guo F, Xuan C. 2015. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in cancer stem cells. *Fam Cancer* 14:19–23.
- Zhivotovsky B, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. 2009. Adenine nucleotide translocase: a component of the phylogenetically conserved cell death machinery. *Cell Death Differ* 16:1419–1425.