

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Biologická charakteristika buněk kolorektálního karcinomu v modelech *in vitro* a její využití při individualizaci terapie**

**Stanislav John**

**Autoreferát disertační práce**  
**Doktorský studijní program: Lékařská biologie**

**Hradec Králové**

**2019**

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Lékařská biologie na Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Stanislav John  
Ústav lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové  
a Klinika onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.  
Ústav lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové

Oponenti: MUDr. Karel Čwierotka, Ph.D.  
Onkologická klinika Fakultní nemocnice Olomouc  
  
doc. MUDr. Igor Kiss, Ph.D.  
Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav  
Brno

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR ..... dne  
..... v ..... od ..... hod.

*(bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času)*

Tato práce vznikla za podpory grantu PRVOUK P37/01

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Lékařské biologie  
Garant studijního programu

<b>Obsah</b>	<b>Strana</b>
<b>1. Souhrn</b>	4
<b>2. Summary</b>	4
<b>3. Úvod</b>	5
<b>3.1 Kolorektální karcinom</b>	5
<b>3.2 Buněčná smrt</b>	6
<b>3.3 Mechanizmy rezistence k buněčné smrti u CRC</b>	7
<b>3.4 Irinotekan v léčbě nádorových onemocnění</b>	
<b>4. Cíle</b>	8
<b>5. Metodika</b>	8
5.1 Buněčné linie a kultivační podmínky	8
5.2 Nasazování do testů a ovlivnění	8
5.3 Chemikálie	9
5.4 Metodika testů	9
5.4.1 Test DNA syntézy	9
5.4.2 Test WST-1	9
5.4.3 Dynamická morfologie buněk	10
5.4.4 Test poškození DNA	10
5.4.5 Adheze buněk	10
5.4.6 Metylace DNA	11
5.4.7 Detekce apoptózy	11
5.4.8 Uvolňování cytochromu c z mitochondrií	11
5.4.9 Aktivita kaspáz	11
5.4.10 Test buněčné signalizace	12
5.4.11 Exprese ATM, ATR a CHK kináz	12
5.4.12 Aktivita MAPK	12
5.4.13 Plazmidová transfekce	12
5.4.14 Transkripce <i>TP53</i>	13
5.4.15 Test permeabilizace lyzozomálních membrán	13
5.4.16 Detekce autofagie	13
5.4.16.1 Fluorescenční mikroskopie	13

5.4.16.2	Exprese vybraných genů spojených s autofagií	13
5.4.17	Detekce senescence	14
5.4.18	Příprava lyzátů a imunobloting	14
5.4.19	RNA interference	14
5.4.20	Exprese microRNA	15
5.5	Statistická analýza	15
<b>6.</b>	<b>Výsledky</b>	<b>15</b>
6.1.	Vliv CPT-11 na růstové parametry nádorových i nenádorových střevních buněk	16

## **7. Diskuze**

## **8. Závěry**

## **9. Použitá literatura**

## **10. Přehled publikační činnosti autora**

## 1. Souhrn

Zhoubné nádory patří celosvětově na druhé místo mezi příčinami úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocněních. Trend se ale zvláště v rozvinutých zemích (dle Světové zdravotnické organizace, WHO – World Health Organization) vyrovnává, v některých oblastech se dokonce diagnóza zhoubného novotvaru dostala již na místo první. (Ferlay 2012) Protože se rakovina stala ve dvacátém století závažným celosvětovým socioekonomickým problémem, patří její výzkum ve spolupráci s Mezinárodní agenturou k výzkumu rakoviny (IARC – International Agency for Research on Cancer) k prioritám WHO. (Mendis 2014) Incidence stále roste, a to jak relativně, tak absolutně, což je dáno, mimo jiné, celkovým stárnutím populace a zvyšováním průměrného věku obyvatel. Protože se k hlavním prognostickým faktorům výskytu nádorových onemocnění řadí věk, mají tak lidé větší šanci se nádorového onemocnění „dožít“. Zlepšily se i možnosti diagnostiky, a tak je mnoho nádorů odhaleno již v časných stádiích, což zpětně zlepšuje možnosti a úspěšnost léčby. K tomu přispívá i zavedení některých screeningových vyšetření do běžné zdravotní praxe (např. mamografie, prostatický specifický antigen, test okultního krvácení nebo koloskopie) a s tím spojená osvěta v běžné populaci. (Dušek *et al.* 2005; Mendis 2014)

V neposlední řadě se za posledních 15 až 20 let značně rozvinula léčba samotná, kde je pak zejména snaha o terapii „šitou na míru“ pacientovi. Ta zahrnuje nové mini-invazivní chirurgické techniky včetně využití roboticky asistované chirurgie, nové ozařovací techniky (IG-IMRT – Image-Guided Intensity-Modulated Radio-Therapy), používání tzv. cílené (někdy též nazývané biologické) léčby, využívání nových cytostatických léků nebo zlepšení podpůrné terapie a prevence nežádoucích účinků při léčbě pacienta. (Sudhakar 2009) To vše je umožněno též díky pokrokům v základním výzkumu molekulární biologie nádorů.

Jednou z možností tohoto výzkumu je využití nádorových buněčných linií jako modelového systému. Pro svou podobnost s původním nádorem se řadí mezi důležité nástroje ke zkoumání jejich biologické povahy, chování a případné odpovědi na zvolenou léčbu. (Langdon 2004) V předkládané práci se blíže věnujeme vlivu cytostatika irinotekanu na růstové charakteristiky, biologické vlastnosti a zejména buněčnou smrt vybraných stabilizovaných nádorových linií kolorektálního karcinomu *in vitro*. Výsledky získané těmito experimenty mohou přispět k lepší charakterizaci mechanismů buněčné odpovědi na navozené poškození a v širším kontextu i ke zvýšení účinnosti této cytostatické léčby.

## 2. Summary (Biological characteristics of colon cancer cells in *in vitro* models and its use for individualization of therapy)

Malignant tumours are the second most common cause of death worldwide right behind the cardiovascular diseases. This tendency is by the opinion of the World Health Organisation increasing especially in well developed countries. (Ferlay 2012) Because cancer has become in 20th century serious social and economic problem, research on it is for WHO and IARC (International Agency for Research on Cancer) the top priority. (Mendis 2014) Relative and absolute incidence is also rising. The reason, besides others, is aging of population. Because age is one of the main prognostic factors for cancer, people are more likely to „survive“ till the onset of it.

However, diagnostic options are improved and many tumours are detected in early stage which in turn boosts the ability and effectiveness of treatment. Screening programmes are introduced into routine medical practice (e.g. mammography, prostate-specific antigene, occult blood testing or colonoscopy) inducing awareness in the general population. (Dušek *et al.* 2005; Mendis 2014) Last but not least, the treatment itself has developed considerably over the last 15 to 20 years, with the focus on patient "tailor-made" therapy. It includes new mini-invasive or robot-assisted surgical techniques, new radiation techniques (IG-IMRT – Image-Guided Intensity-Modulated Radio-Therapy), use of targeted (sometimes also called

biological) treatment, administration of new cytostatic drugs, improvement of supportive therapy and prevention of side effects of the treatment. (Sudhakar 2009) All these advances are also possible due to basic molecular biology research.

Use of tumour cell lines as a model system represents one of these options. Its similarity to the original tumour allows us to investigate biological nature, behaviour and possible response to the chosen treatment. (Langdon 2004) In the present work we focus on the cytostatic effect of irinotecan on selected colorectal cancer cell lines in vitro, particularly on the characterization of cell growth and death. The results obtained by these experiments may contribute to a better understanding of cellular response to induced injury and, in a broader context, to increase efficiency of this cytostatic therapy.

### 3. Úvod

#### 3.1. Kolorektální karcinom

Celosvětově je kolorektální karcinom (CRC) považován za druhý až třetí nejčastější typ nádorového onemocnění s incidencí 1,4 miliónu nových případů ročně. Úmrtnost na toto onemocnění je též stále vysoká. Dle Národního onkologického registru (NOR) se Česká republika bohužel řadí celosvětově na přední příčky v incidenci některých nádorových onemocnění (adenokarcinom pankreatu, tumory ledviny), a to včetně CRC. Právě pro masivní výskyt kolorektálního karcinomu byla Česká republika jednou z prvních zemí, kde bylo zavedeno systematické vyšetřování rizikové populace (tzv. screening).

Pokud by se měly shrnout rizikové faktory vzniku CRC, jednalo by se kromě dědičnosti obecně o jevy spojené s moderním stylem života, jakými jsou strava s vysokým obsahem červeného masa a bohatá na živočišné tuky, nedostatek vlákniny, konzumace alkoholu, nedostatečný příjem vitamínů a stopových prvků. Nezpochybnitelný negativní vliv je též prokázán u obezity a kouření. Vyšší riziko vzniku CRC může být spojeno s nespecifickými střevními záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida). (Huang and Merchea 2017)

Klasická teorie vzniku kolorektálního karcinomu předpokládá, že nahromaděním genetických a epigenetických změn v rámci poškození těchto buněk dojde k transformaci a vzniku buňky s nádorovým potenciálem. Další klonální expanzí této buňky potom může vzniknout nejprve benigní novotvar, tzv. polyp, později až maligní tumor, který se za určitých podmínek šíří dále do těla. (Vogelstein *et al.* 1988) Rozsah tohoto šíření – staging – popisuje mezinárodní TNM klasifikace tumorů, která hodnotí velikost a invazivitu tumoru (T), množství zasažených lymfatických uzlin (N) a tvorbu metastáz (M).

Z histopatologického hlediska se z 90 % jedná o adenokarcinomy. Histopatologický stupeň diferenciacie nádoru se též určuje ve stupních – grading – a přibližně odpovídá i agresivitě tumoru. (Sobin *et al.* 2009)

Zásady léčby jsou zpracovány do standardizovaných postupů dle dostupných důkazů založených hlavně na statisticky validních klinických studiích. Ve stručnosti, časná stádia kolorektálního karcinomu jsou obecně léčena pouze chirurgicky, při lokální pokročilosti či postižení regionálních uzlin nádorem se již dostává do popředí použití adjuvantní chemoterapie založené na bázi 5-fluorouracilu (5FU) případně v kombinaci s oxaliplatinou. V rámci paliativní léčby při diseminaci/generalizaci nádoru nebo při jeho lokální pokročilosti s nemožností chirurgické intervence je to potom opět chemoterapie na bázi 5FU v kombinaci s oxaliplatinou či irinotekanem (režimy FOLFOX, FOLFIRI). Tyto režimy se dále kombinují spolu s biologickou („cílenou“) léčbou, poněkud více inhibitory vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF<sub>i</sub>) – bevacizumab/aflibercept, či receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR<sub>i</sub>) – panitumumab/cetuximab. V posledních několika letech se do popředí dostává i léčba tzv. checkpoint-inhibitory a ovlivňování (nastartování) imunitního systému nemocného vůči nádorům s velkou mutační náloží. (Ryan *et al.* 2017) Radioterapie je vyčleněna jako lokální léčba zejména u tumorů rekta.

Kolorektální karcinom může vznikat cestou chromosomální nestability (CIN), mikrosatelitové nestability (MSI) a cestou epigenetické nestability při fenotypu metylace CpG ostrůvků (CIMP). Tyto mechanismy se též mohou vzájemně překrývat, v některých případech nebyl přesný mechanismus vzniku dosud objasněn. Na vzniku kolorektálního karcinomu se podílí též epigenetické změny. Zahrnují hlavně hypermetylaci promotorových částí tumor supresorových genů, jejich umlčení a tím ztrátu exprese. (Parsons *et al.* 2012) V patogenezi CRC se uplatňuje několik klíčových genů a signálních drah, např. WNT/ $\beta$ -katenin (kanonická dráha), dráha MAPK (jedna z nejčastěji mutovaných drah u lidských nádorů obecně, dráha fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K – významná pro svou spojitost buněčným metabolismem), TP53 (dráha „strážce genomu“) či dráha TGF- $\beta$ . Dále se této signalizaci mohou účastnit i nekódující malé molekuly

### 3.2 Buněčná smrt

Níže jsou stručně uvedeny vybrané nejvýznamnější typy buněčné smrti, které jsou zároveň i nejlépe prozkoumány, a to zejména ve spojitosti s patogenezi kolorektálního karcinomu.

3.2.1 Nekróza: Touto formou buněčné smrti se označuje náhlý, většinou neřízený (neprogramovaný) proces vedoucí k masivnímu bobtnání buňky (oncosis) a nitrobuněčných organel a dále k uvolnění autolytických enzymů, které začnou narušovat další buněčné struktury včetně buněčných membrán. Poškozením membránových kompartmentů následně dojde k vylití buněčného obsahu do mezibuněčného prostoru, což často vyvolá zánětlivou odpověď včetně aktivace imunitního systému, dojde k jizvení v místě zánětu a eventuálnímu dalšímu poškození okolních struktur. (Galluzzi *et al.* 2018)

3.2.2 Apoptóza: Morfologicky pozorujeme celkové zmenšení buněčného objemu, vznik membránových výdutí a puchýřů (blebbing), fragmentaci jádra (pyknosis) následovanou fragmentací celé buňky a vznikem apoptotických tělísek, tedy částí rozpadlé buňky stále obklopené buněčnou membránou. Tato tělíška jsou potom většinou odstraněna fagocytózou okolními buňkami nebo buňkami imunitního systému. (Kerr *et al.* 1972) Buněčná sebevražda je umožněna aktivací proteinů označovaných jako kaspázy (cysteinové aspartát-specifické proteázy), které plní v tomto procesu funkci signální i výkonnou. (Thornberry and Lazebnik 1998) Takto složitý proces musí být i velmi precizně řízen. Uplatňuje se zde systém zpětných vazeb a jakákoliv aktivace je opět spojena s inhibicí na vyšší úrovni řízení. Klíčovou roli hrají uzlové proteiny. Typickým příkladem je protein TP53, jehož fyziologickou funkcí je proapoptotické působení a tím tedy přirozená obrana vůči nádorovému růstu. I z toho důvodu je u většiny nádorů jeho funkce či aktivita změněna.

3.2.3 Autofagie: Autofagie je evolučně silně konzervativní a přísně geneticky kontrolovaný děj recyklace částí buněk. Morfologicky pozorujeme smrštění celé buňky a postupnou degradaci poškozených organel a proteinů umožňující opětovné využití mastných kyselin a aminokyselin k syntéze nových makromolekul či k zachování fyziologických hladin buněčného ATP. (Maiuri *et al.* 2007)

3.2.4 Senescence: Buněčná senescence neboli stárnutí buněk je fyziologický proces, který také úzce souvisí s buněčnou smrtí. Uplatňuje se hlavně během embryonálního vývoje (udržování buněk trofoblastu, vývoj tkání) či při poškození tkání. Jeho cílem má být postupné odstranění opotřebovaných buněk, které již ztratily svoji funkci a jejich náhrada za nové, tedy regenerace tkáně. Buňka podstupuje změny, kterými v ideálním případě dává najevo zbytku organismu, že ztratila svoji funkci a mělo by dojít k její likvidaci. (Munoz-Espin and Serrano 2014)

### 3.3 Mechanizmy rezistence k buněčné smrti u CRC

Deregulace buněčné smrti patří ke klíčovým změnám umožňujícím vznik a následnou proliferaci nádorových buněk CRC. Změny postihují všechny známé mechanismy a typy buněčné smrti – apoptózu, nekrózu (nekroptózu) či autofagii. Odhalení molekulárních mechanismů těchto změn by mohlo zásadně přispět k prevenci a též objevu nových léčebných modalit v boji s touto rozšířenou chorobou. Rezistence vůči buněčné smrti je u CRC komplexní proces důležitý nejen pro jeho vznik, ale i pro další progresi a v neposlední řadě značnou měrou ovlivňuje rezistenci na léčbu. Z podstaty věci je zajištění rovnováhy mezi proliferací a smrtí zásadní pro obnovu a funkci střevního epitelu. (Huang and Yu 2015) Jak již bylo zmíněno výše, kritickou roli v regulaci buněčné smrti hraje protein TP53. Jeho mutace či změny na úrovni jím kontrolované signální dráhy mají vážné důsledky pro další modulaci stresových podnětů působících na nádorové buňky, tedy i pro progresi onemocnění. Spolu s dalšími signálními proteiny (STAT3, NFκB), TP53 zásadně ovlivňuje nejen případnou apoptózu, ale též dráhy přežití s důrazem na autofagii. Obecně je u nádorových buněk s defektním TP53 pozorována zvýšená úroveň autofagie. (Tasdemir *et al.* 2008) Rezistence k buněčné smrti nádorových buněk je ale ovlivňována i celkově z vnějšku, a to nádorovým mikroprostředím. (Nishihara *et al.* 2003)

### 3.4 Irinotekan v léčbě nádorových onemocnění

3.4.1 Metabolismus: V lidském těle je metabolismus CPT-11 pod vlivem velké interindividuální variability, ze které pramení také různá míra nežádoucí účinků. Důležitá je jeho hydrolýza cestou lidských karboxyesteráz CES 1 a 2 (přítomny v plazmě, enterocytech, hepatocytech, ale i nádorových buňkách) na aktivní metabolit SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin), který má asi 1.000x vyšší účinnost. Aktivní SN-38 je inaktivován glukuronidací enzymem uridindifosfát-glukuronosyltransferázou a vyloučen spolu se žlučí do střeva. Toto je jeho hlavní eliminační cesta, ze které však může být za přispění bakteriální  $\beta$  glukuronidázy vstřebáván zpět do krevního oběhu enterohepatálním oběhem.

3.4.2 Mechanismus účinku: Mechanismus účinku irinotekanu spočívá po jeho aktivaci na SN-38 ve specifické blokadě topoizomeráz I. třídy. Tyto enzymy bez ATP aktivity se vyskytují jak v eukaryotických, tak prokaryotických buňkách. Mají za úkol štěpení jedno nebo dvouřetězcových vláken DNA a jejich následné spojení, rozrušují tak terciární strukturu DNA beze změny struktury primární nebo sekundární. Tímto mechanismem umožňují rozpletení DNA vlákna, a to hlavně v procesech jakými jsou transkripce a replikace DNA, rekombinace, chromozomální kondenzace a oddělení prolínajících se vláken DNA během mitózy.

3.4.3 Irinotekan v léčbě nádorových onemocnění: Irinotekan se využívá hlavně v paliativní léčbě pokročilého a metastatického kolorektálního karcinomu, a to buď v monoterapii nebo v kombinaci s jinými cytostatiky (oxaliplatinou, 5-fluorouracil) a cílenou léčbou. V současné době je zkoumáno jeho možné využití v léčbě dalších typů nádorů, například tumorů centrálního nervového systému, neuroendokrinních tumorů a tumorů děložního čípku. (Hahn *et al.* 2006; Wall and Wani 1996) Nežádoucí účinky podání irinotekanu mohou zahrnovat průjem (zapojení bakteriální  $\beta$ -glukuronidázy do opětovné aktivace na SN-38), myelodysplastický syndrom a neutropenii.



#### 4. Cíle práce

A. Obecně určit citlivost nádorových i nenádorových střevních buněk k irinotekanu (CPT-11). Určit vhodné koncentrační a časové rozmezí, při kterém CPT-11 negativně ovlivňuje buněčnou proliferaci, navozuje stres a indukuje buněčnou smrt. U nenádorových střevních buněk potom tyto účinky hlouběji posoudit.

B. Zjistit vliv CPT-11 na růstové parametry a viabilitu modelu pokročilého kolorektálního karcinomu s mutovaným TP53. Určit a posoudit vliv klíčových mediátorů stresové signalizace a buněčné smrti tohoto nádorového modelu.

C. Vliv CPT-11 na růstové parametry, viabilitu a buněčnou smrt nádorových střevních buněk s odstraněným TP53. Objasnit význam mutace tohoto proteinu v širším kontextu stresové signalizace a buněčného přežívání.

D. Ze zjištěných výsledků určit vhodné terapeutické cíle k možnému prohloubení účinku cytostatické léčby či zmírnění nežádoucích účinků na normální buněčné populace.

#### 5. Metodika

5.1 Buněčné linie a kultivační podmínky: K našemu výzkumu jsme postupně vybrali 2 linie reprezentující model CRC a dále 2 nenádorové linie představující epitelové a mezenchymální typy buněk běžně se vyskytujících v tlustém střevě.

SW-620 (ATCC® CCL-227™): Tato buněčná linie byla odvozena z uzlinové metastázy nízce diferencovaného adenokarcinomu dospělého muže. Jedná se o hyperploidní adherentní epitelové buňky bez mikrokloků, které v kultuře vykazují variabilní morfologii, migrační a invazivní potenciál. Linie nese mutaci v genu *TP53* (bodová mutace G → A v kodonu 273), exprimuje onkogeny *c-MYC*, *K-RAS*, *H-RAS*, *N-RAS*, *MYB*, *SIS* a *FOS*.

HCT-116 (ATCC® CCL-247™): Tato linie lidských epitelových buněk odvozených z kolorektálního adenokarcinomu dospělého muže je téměř diploidní, v kultuře roste adherentně. Buňky nemigrují ani nevykazují invazivní potenciál. Linie nese mutaci v kodonu 13 onkogenu *RAS*. Gen *TP53* je nemutovaný a funkční. Jako variantu jsme v některých experimentech použili též linii HCT-116-P53KO s vyrazenými oběma alelami genu *TP53* (delece exonu 2).

NCM-460 (Incell Corporation): Buněčná linie odvozená z buněk normální sliznice tlustého střeva zdravého dospělého muže.

NCF-CCD-18 (ATCC® CRL-1459™): Netumorigenní buněčná linie, která je odvozena z fibroblastové populace tlustého střeva. Odebrána od dospělé ženy.

Tyto linie byly pěstovány v příslušných médiích případně s užitím antibiotik v inkubačním boxu při stabilní teplotě 37 °C ve vlhčené atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Buňky byly pasážovány za pomoci 0,05% roztoku EDTA/trypsin přibližně 2x týdně po dosažení 80 % konfluence. Pro účely vlastní experimentální práce byly použity buňky v nízkých pasážích a bez mykoplazmatické kontaminace.

5.2 Nasazování do testů a ovlivnění: Buňky jednotlivých linií byly nasazovány v rámci jednotlivých testů do různých kultivačních nádob, při manipulaci v experimentu bylo vždy postupováno dle zásad dobré laboratorní praxe. klasické kultivační lahve (malé či střední), cytomůrky, podložní skříčka, 96jamkové destičky či filmovací komůrky. Po nasazení byly pak kultury přemístěny do inkubátoru (37 °C, vlhčená atmosféra s 5 % CO<sub>2</sub>) na 24 hodin. Vždy se nasazovaly paralelně kontrolní (neovlivněné) a testované (ovlivněné danými koncentracemi irinotekanu popřípadě i jinými chemickými stimulatory či inhibitory) kultury, přičemž se používaly buněčné suspenze o různé koncentraci tak, aby na počátku experimentu

činila buněčná konfluenc v dané kultivační nádobě cca 50-60 %. Experimenty probíhaly v časovém intervalu až 48 h ovlivnění. Irinotekan 20mg/ml v zásobním roztoku byl ředěn s kultivačním médiem dle příslušné buněčné linie do požadované koncentrace, ředění probíhalo bezprostředně před aplikací do kultury. Obdobným způsobem byly ředěny všechny další chemikálie.

5.3 Chemikálie: Irinotekan byl získán od firmy Pfizer (Pfizer GmbH, Praha, Česká republika). Anexin V-FITC, kyselina 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonová (CHAPS), křenová peroxidáza, Triton X, BrdU, akridinová oranž, dithiothreitol (DTT); 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), propidium jodid, monodansylkadaverin (MDC), Brilliant Coomassie Blue, specifické inhibitory autofagie 3-metyladenin (3-MA) a chloroquin byly získány od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Protilátky monoklonální králičí anti-p21, anti-ATM, anti-ATR, anti-Chk1 a anti-Chk2 byly získány ze Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, Spojené státy americké). Protilátky monoklonální anti-phospho-Ser-139 H2A.X, anti-LAMP-1, polyklonální králičí anti-Bax, monoklonální králičí anti-LC3, monoklonální králičí anti-Becnin-1, monoklonální myši anti-p62, monoklonální myši anti-TP53, monoklonální králičí anti-COX-IV a monoklonální myši anti-beta aktin, monoklonální králičí anti-phospho-p53, monoklonální myši anti-acetyl-TP53, monoklonální králičí anti-p16 a trizol byly získány z Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts, Spojené státy americké). Sekundární protilátky pocházely od firem Alexis Corporation (Lausanne, Švýcarsko) a Dako (Glostrup, Dánsko). 4-[3-(4-idophenyl)2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonát (WST-1) byl získán od Boehringer Mannheim-Roche (Basilej, Švýcarsko). JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1'3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin jodid) byl získán od Life-Technologies Czech Republic (Praha, Česká republika). Specifické inhibitory kaspázy 2 z-VDVAD-fmk a příslušný substrát Ac-VDVAD-AFC, kaspázy 3 z-DEVD-fmk a příslušný substrát DEVD-AFC a kaspázy 9 z-LEHD-fmk a substrát LEHD-AFC byly získány z firmy Calbiochem (La Jolla, Kalifornie, Spojené státy americké). Všechny další chemikálie byly nejvyšší analytické čistoty.

#### 5.4 Metodika testů

5.4.1 Test DNA syntézy: U kontrolních a irinotekanu-vystavených buněk v 96jamkových destičkách byl změřen přírůstek syntézy DNA metodou ELISA BrdU. 24 hodin před koncem inkubace bylo do každé jamky přidáno BrdU (finální koncentrace 10  $\mu$ M). Na konci inkubace bylo médium odstraněno a buňky byly po dobu 30 minut při pokojové teplotě fixovány a značeny anti-BrdU protilátkou. Po 60 minutách inkubace a třech promytích byl k buňkám přidán substrát s luminolem a vzniklá chemiluminiscence byla měřena pomocí přístroje TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grönig, Rakousko). Výsledky (relativní světelné jednotky (RLU)) byly vyjádřeny jako procento kontroly.

5.4.2 Test WST-1: Proliferační aktivita buněk po použití irinotekanu byla alternativně stanovována kolorimetrickou metodou WST-1, která určuje aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz a jiných cytosolových enzymů v buňkách prostřednictvím štěpení tetrazoliové soli na barevný formazan. Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v 96jamkových destičkách byly propláchnuty čerstvě připraveným PBS (phosphate buffered saline), a do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku WST-1 v kultivačním médiu. Kultivace pak pokračovala další 2 hodiny. Poté byla v jednotlivých jamkách spektrofotometricky změřena absorbance (450/650nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grönig, Rakousko)). Získané hodnoty byly korelovány oproti slepému vzorku. Data o metabolické aktivitě buněk byla dále korelována se změnami v množství celkového proteinu u irinotekanem ovlivněných buněk metodou Coomassie Brilliant Blue. Kontrolní a

irinotekanu-vystavené buňky v 96jamkových destičkách byly fixovány roztokem etanolu a ledové kyseliny octové. Poté byl k nim přidán roztok Coomassie Brilliant Blue a destičky byly inkubovány v temnu při pokojové teplotě 1 hodinu. Následně bylo barvivo odstraněno, buňky opláchnuty a lyzovány čerstvě připraveným lyzačním roztokem octanu draselného a etanolu. Destičky byly umístěny na 1 hodinu na třepačku a poté byla změřena absorbance výsledného produktu spektrofotometricky (620/450 nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grönig, Rakousko)).

5.4.3 Dynamická morfologie buněk: Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky ve speciálních plastových miskách se skleněným dnem byly přemístěny do pozorovací komory mikroskopu BioStation IM (Nikon, Praha, Česká republika), která plní funkci též inkubátoru. Dynamika buněčné morfologie, chování i všech jejich změn byla simultánně vícekanálově snímána v několika úrovních, při různých zvětšeních a z různých míst kultury. Získané videosekvence byly zpracovány a následně analyzovány a hodnoceny prostřednictvím softwarového programu NIS Elements AR 3.20 (Nikon, Praha, Česká republika).

5.4.4 Test poškození DNA: Poškození DNA u testovaných buněčných linií po jejich ovlivnění irinotekanem bylo stanovováno pomocí detekce přítomnosti fosforylovaného histonu H2A.X v jádrech buněk. Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v 96jamkových destičkách byly promyty PBS a fixovány 4% formaldehydem. Po oplachu a fázi permeabilizace a blokování antigenů (30 minut, roztok 5% mléka s TRITONEM), byly vzorky inkubovány při 4 °C, v temnu 90 minut s primární protilátkou (králičí anti-phospho Ser-139 H2A.X, 1:100). Po skončení inkubace byly buňky promyty PBS a dále inkubovány se sekundární protilátkou (anti-králičí, 1:250, temno, 60 minut, pokojová teplota). Přítomnost fosforylovaného histonu H2A.X byla měřena spektrofotometricky (485/520 nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grönig, Rakousko)). Výsledky byly vyjádřeny jako nárůst intenzity fluorescence ve srovnání s neovlivněnou kontrolou.

Pro mikroskopickou detekci DNA zlomů využitím fosforylovaného histonu H2A.X byly kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky na podložních sklech opláchnuty studeným PBS a buňky následně 15 minut fixovány metanolem při pokojové teplotě. Po dalším oplachu byly vzorky inkubovány při 4 °C, v temnu 90 minut s primární protilátkou (králičí anti-phospho Ser-139 H2A.X, 1:200). Po skončení inkubace byly skla opláchnuta PBS a dále inkubována se sekundární protilátkou (anti-králičí, 1:250, temno, 60 minut, pokojová teplota) konjugovanou se zelenou fluorescenční značkou Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (FITC). Buněčná jádra byla dobarvena 15 minut fluorescenčním roztokem DAPI o koncentraci 10 µg/ml. Následně byla skla s nabarvenými buňkami zamontována a prohlížena ve fluorescenci na mikroskopu Nikon Eclipse E400 (Nikon, Praha, Česká republika) při excitační vlnové délce filtru 450-490 nm a emisní 510 nm. Fotodokumentace byla pořízena pomocí barevné digitální kamery COOL 1300 firmy VDS (Vosskühler, Spolková republika Německo) a následně analyzována programem NIS Elements AR 3.20 firmy Nikon (Praha, Česká republika).

5.4.5 Adheze buněk: Adhesivní vlastnosti buněk směrem k extracelulární matrix byly měřeny kitem Vybrant<sup>™</sup> Cell Adhesion Assay firmy Invitrogen (Praha, Česká republika). Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v kultivačních lahvích byly trypsinovány, propláchnuty PBS, resuspendovány v kultivačním médiu, následně smíseny s 5 µl roztoku calcein AM (finální koncentrace 5 µM). Následovala inkubace 30 minut při 37 °C, proplach předeřátým kultivačním médiem a opětovná resuspendace. 100 µl suspenze takto obarvených buněk bylo pipetováno do jednotlivých jamek 96jamkové destičky pokrytými proteiny extracelulární matrix a opět inkubováno (60 minut, 37 °C). Po této době byly neadherované (plovoucí) buňky opatrně odmyty, destičky byly několikrát propláchnuty médiem a PBS a byla měřena fluorescence (490/525 nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grödig,

Rakousko)). při vlnových délkách 490/525 nm. Výsledky adheze byly vyjádřeny jako procento kontroly u kultur ovlivněných irinotekanem.

5.4.6 Metylace DNA: Změny v metylaci DNA byly měřeny zavedeným kitem Methylamp™ Global DNA methylation (Epigentek, Inc. (New York, Spojené Státy Americké). Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v kultivačních lahvích byly trypsinovány a fixovány 4% formaldehydem. DNA z těchto vzorků byla extrahována fenol-chloroformovou metodou. Dále dle návodu výrobce byla tato DNA nejprve fixována k povrchu jamek detekčních zkumavek a po blokaci konjugována s 5-methylcytosinem (1:1000), který má vysokou afinitu k metylované frakci DNA. Po další konjugaci s detekční protilátkou (1:1000) byl k DNA přidán detekční roztok a následně měřena spektrofotometricky absorbance (450 nm, TECAN SpectraFluor Plus, TECAN Austria GmbH, Grödig, Rakousko)). Výsledky byly vyjádřeny změnou absorbance vzorků ovlivněných buněk a jejich kontrol.

5.4.7 Detekce apoptózy – obecná přítomnost: Přítomnost a rozsah apoptózy u buněk ovlivněných irinotekanem byla obecně zjišťována a kvantifikována pomocí dvou komplementárních metod – průtokové cytometrie s využitím barvení buněk propidium jodidem a mikroskopicky s využitím specifického barvení buněčných jader DAPI. V prvním případě byly CPT-11 ovlivněné buňky (kultivované výše zmíněným způsobem) převedeny do suspenze pomocí trypsinu a po promytí PBS, fixovány 70% etanolem. Poté byly buňky resuspendovány v roztoku obsahujícím Triton X-100, RNazu A a propidium jodid. Po inkubaci (30 minut, 4 °C a v nepřítomnosti světla) byl změřen poměr apoptotických buněk s hypodiploidním obsahem DNA pomocí průtokového cytometru Cell Lab Quanta™ SC (Beckman Coulter Inc., Brea, Kalifornie, USA).

Pro mikroskopickou detekci apoptózy byly kontrolní a CPT-11-vystavené buňky na podložních sklech opláchnuty studeným PBS a buňky následně fixovány metanolem při pokojové teplotě. Po dalším oplachu byly vzorky 15 minut barveny fluorescenčním roztokem DAPI o koncentraci 10 µg/ml. Následně byla skla s nabarvenými buňkami zamontována a prohlížena ve fluorescenci (Nikon Eclipse E400 (Nikon, Praha, Česká republika)) při excitační vlnové délce filtru 330-380 nm a emisní 420 nm. Fotodokumentace byla pořízena pomocí barevné digitální kamery COOL 1300 firmy VDS (Vosskühler, Spolková republika Německo) a následně analyzována programem NIS Elements AR 3.20 firmy Nikon (Praha, Česká republika). U každého vzorku byla prováděna morfologická analýza u alespoň 1000 buněk.

5.4.8 Uvolňování cytochromu c z mitochondrií: Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v kultivačních lahvích byly převedeny pomocí trypsinu do suspenze, ze které byly připraveny mitochondriální a cytosolické lyzáty pomocí mitochondriálního fractionačního kitu firmy Active Motif (Rixensart, Belgie) dle instrukcí výrobce.

Množství cytochromu c v lyzátech bylo následně stanovováno pomocí kitu FunctionElisa™ Cytochrom C (Active Motif, Rixensart, Belgie), opět dle instrukcí výrobce pomocí spektrofotometrického měření absorbance (450 nm, Titertek Multiscan MCC/340 (ICN Biochemicals, Frankfurt, Spolková republika Německo)). Výsledky byly vyjádřeny jako nárůst absorbance vzorku při 450 nm/µg lyzátu/jamku.

5.4.9 Aktivita kaspáz: Buňky ovlivněné irinotekanem a příslušné kontroly byly v daných časových intervalech sklizeny seškrábnutím a centrifugovány (600 G, 5 minut). Poté byly na ledu připraveny lyzáty užitím lyzačního roztoku obsahujícím HEPES, CHAPS a DTT. Lyzáty byly dále centrifugovány při (14.000 G, 10 minut), supernatant byl odebrán a uložen při teplotě -80 °C. Aktivita kaspáz byla měřena na 96jamkových destičkách využitím kinetické fluorimetrické metody založené na hydrolýze kaspáza-specifického substrátu DEVD-AFC pro

kaspázu 3. Specifický inhibitor z-DEVD-fmk pro kaspázu 3 byl použit k ověření specificity enzymatické reakce. Obdobně byla měřena aktivita kaspázy 9 (substrát LEHD-AFC, inhibitor z-LEHD-fmk) a kaspázy 2 (substrát Ac-VDVAD-AFC, inhibitor z-VDVAD-fmk). Fluorescence byla zaznamenána spektrofotometricky (460/440 nm a 360/340 nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grödig, Rakousko)). Výsledky byly zaznamenány jako relativní nárůst aktivity vůči neovlivněné kontrole.

5.4.10 Test buněčné signalizace: Pro stanovení úrovně konkrétní buněčné signalizace po poškození DNA u buněk vystavených irinotekanu byl využit komerční kit PathScan® Multi-Target HCA DNA dodávaný Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts, Spojené Státy Americké). Tento kit umožňuje zaznamenat změny signalizace v hlavních uzlech buněčných stresových drah metodou imunofluorescenční detekce fosforylovaných či nefosforylovaných proteinů. Imunofluorescenční detekce a stejně tak kvantifikace se provádí v 96jamkových destičkách. Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v 96jamkových destičkách byly opláchnuty PBS a fixovány 4% formaldehydem. Po blokovací reakci 5% mlékem byly použity následující protilátky: Ser-139 p-H2A.X, Ser-345 p-Chk1, Thr-68 p-Chk2, Ser-15 p-TP53, p21, Tyr-15 cdc2, Thr-180/Tyr182 p-p38 a, Thr-183/Tyr-185 p-SAPK/JNK) Pro detekční účely bylo využito dobarvení buněčných jader pomocí DAPI, které posloužilo k normalizaci počtu buněk v jamkách. Přítomnost každého markeru byla detekována spektrofotometricky (360/420nm a 485/520nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grödig, Rakousko)). Výsledky byly vyjádřeny jako změna intenzity fluorescence ve srovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami.

5.4.11 Expres ATM, ATR a CHK kináz: Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v kultivačních lahvích byly trypsinovány, centrifugovány a fixovány 4% formaldehydem (30 minut). Poté byly propláchnuty PBS, permeabilizovány směsí metanolu a Tritonu-X v 5% BSA (4°C) a prostřednictvím citrátového pufru v tlakovém vařiči vystaveny teplotě 100 °C po dobu 2 minut. Tato metoda slouží k odkrývání vhodných vazebných epitopů pro pozdější detekci protilátkami. Takto zpracovaná buněčná suspenze byla inkubována s příslušnými primárními protilátkami (p-ATM 1:100, ATM 1:150, p-ATR 1 1:100, ATR 1:150, p-CHK1 1:100, CHK1 1:200, p-CHK2 1:100, CHK2 1:200) přes noc při teplotě 4 °C a v temnu. Po skončení inkubace byly vzorky promyty v PBS a byly přidány příslušné sekundární protilátky konjugované s FITC (1:10). Po opětovném promytí byla měřena fluorescence u minimálně 25 000 buněk na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta™ SC (Beckman Coulter Inc., Brea, Kalifornie, USA). Výsledky byly vyjádřeny jako změna intenzity fluorescence ve srovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami.

5.4.12 Aktivita MAPK: Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v kultivačních lahvích byly škrabkou staženy do suspenze, centrifugovány a z následného buněčného peletu byl připraven celobuněčný lyzát (mechanická cytolýza pomocí injekční stříkačky prováděná na ledu). Aktivita celkové a fosforylované p38, JNK a ERK byla měřena pomocí Elisa kitu od firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Spojené státy americké) a Calbiochem (San Diego, Kalifornie, Spojené státy americké). Celý proces byl prováděn dle návodu výrobce v 96jamkových destičkách. Výsledky byly porovnány s křivkami aktivity celkové a fosforylované p38, JNK a ERK, dodanými ve formě standardu od výrobce. Data byla normalizována na množství proteinu buněčného lyzátu a vyjádřena jako poměr fosforylované ku celkové MAPK ve stejném vzorku. Výsledky získané z buněk po ovlivnění irinotekaniem byly vyjádřeny jako procenta z kontrolních hodnot.

5.4.13 Plazmidová transfekce: V prvním kroku byla normální sekvence genu *TP53* získaná z krve zdravého dobrovolníka zanesena do vektoru pcDNA3.1/Hygro<sup>©</sup> (Invitrogen, Praha, Česká republika). Tento plazmidový vektor se standardně používá pro transienční transfekci

většiny savčích buněk. Následně bylo  $3 \times 10^6$  buněk vybraných linií rozpuštěno v 1 ml média DMEM s 10 % FBS a smíseno s 20  $\mu$ g připraveného vektoru v Lipofectaminu Plus<sup>™</sup> (Invitrogen, Praha, Česká republika) a inkubováno 12 hodin. Takto transfekované buňky byly před ovlivněním CPT-11 ještě dalších 12 hodin inkubovány v čerstvém čistém DMEM s 10 % FBS. Obdobným způsobem byly připraveny nefunkční kontroly (mock) využitím vektoru pcDNA3.1/Hygro<sup>®</sup>/lacZ. Úspěšnost transfekce byla ověřena měřením aktivity  $\beta$ -galaktosidázy průtokovou cytometrií 24h po transfekci a typicky dosahovala 50-60 %.

5.4.14 Transkripce *TP53*: Aktivita transkripce *TP53* u buněčných linií přechodně transfekovaných sekvencí *TP53* a vystavených působení irinotekanu ve stanovené koncentraci byla v daném čase změřena pomocí *P53* Specific Transcription Kit firmy Cayman Europe, (Tallinn, Estonsko) - dle instrukcí výrobce. Transfekované buňky byly kultivovány za standardních podmínek (viz výše); na konci daných intervalů ovlivnění CPT-11 byly převedeny do suspenze pomocí trypsinu, centrifugovány a opláchnuty PBS. Ze suspenze byl následně připraven jaderný lyzát, a to sériemi centrifugací a inkubací s hypotonickými i extrakčními pufrů. Vzniklý jaderný lyzát byl následně pipetován do 96 jamkových destiček ošetřených dsDNA vázajícími *TP53*. Detekce *TP53* probíhala primární protilátkou a následně navázáním sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. Transkripční aktivita *TP53* byla měřena spektrofotometricky (450 nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grönig, Rakousko)). Výsledky byly následně vyjádřeny jako procento kontroly.

5.4.15 Test permeabilizace lysozomálních membrán: Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky kultivované na 96jamkových destičkách byly barveny 5 $\mu$ M akridinovou oranží 15 minut na konci každého pokusného intervalu. Poté byly buňky dvakrát opláchnuty čerstvým kultivačním médiem. Zaznamenán byl nárůst difúzní cytosolové zelené fluorescence odpovídající akridinové oranží uvolněné z lysozomů (490/530 nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grönig, Rakousko)). Výsledky byly následně porovnány s neovlivněnou kontrolou. Komplementárně byly též buňky narostlé na podložních sklech vystavené irinotekanu a jejich příslušné kontroly barveny 30 minut 5 $\mu$ M akridinovou oranží, následně opláchnuty kultivačním médiem a zhotoveny preparáty. Tyto byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 400 (Nikon, Praha, Česká republika) při vlnové délce 510-560/590nm. Pořízené fotografie kamerou COOL 1300 (VDS, Vosskuhler, Spolková republika Německo) byly analyzovány za pomoci programu NIS Elements AR 3.20 a minimálně 1.000 buněk bylo použito k morfometrické analýze.

#### 5.4.16 Detekce autofagie

5.4.16.1 Fluorescenční mikroskopie: Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v 96jamkových destičkách s transparentním dnem byly inkubovány ve tmě spolu s MDC v DMSO po dobu 15 minut. Po inkubaci byly vzorky dvakrát opláchnuty PBS a fluorescence byla změřena spektrofluorimetricky (390/455 nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grönig, Rakousko)). Výsledky byly znázorněny jako relativní nárůst MDC-specifické fluorescence oproti neovlivněné kontrole.

5.4.16.2 Expres vybraných genů spojených s autofagií: Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v kultivačních lahvích byly převedeny do suspenze trypsinací a centrifugací. V PBS opláchnutém a resuspendovaném buněčném peletu byla separována celková RNA trizolovou extrakcí. U takto získané RNA byla provedena RT-PCR v reálném čase (50 cyklů) na cykleru LightCycler 1.5 (Roche, Praha, Česká republika) dle následujících reakčních podmínek: 94 °C (30s), 60 °C (35s), 73 °C (30s); sekvence primeru LC3B (forward) 5'-AAAGATGTCCGACTTATTCGAGAG-3', (reverse) 5'-ACTTCATACACCTCTGAGATTGG-3', sekvence primeru BEKLIN-1 (forward) 5'-

TGTCACCATCCAGGAACTCA-3', (reverse) 5'-CTGTTGCACTTTCTGTGGA-3', sekvence primeru SQSTM1 – p62 (forward) 5'-ATCGGAGGATCCGATGT-3', (reverse) 5'-TGGCTGTGAGCTGCTCTT-3', sekvence primeru  $\beta$ -aktin (forward) 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3', (reverse) 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGACAG-3'. Exprese amplikonu byla srovnávána s mRNA  $\beta$ -aktinu. Ze získaných dat byl spočítán rozdíl exprese mezi jednotlivými zmíněnými geny.

5.4.17 Detekce senescence: Buňky ovlivněné irinotekanem a příslušné kontroly kultivované v inkubačních miskách byly barveny na přítomnost  $\beta$ -galaktosidázy kitem Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts, Spojené Státy Americké)) dle doporučení výrobce: Buňky byly v miskách nejprve promyty PBS a následně byl přidán 1 ml fixačního roztoku. Vzorky byly inkubovány při 15 minut při pokojové teplotě. Po oplachu PBS byl přidán barvicí roztok detekující  $\beta$ -galaktosidázu. Misky byly zakryty parafinovou fólií a inkubovány přes noc při 37 °C v inkubátoru bez CO<sub>2</sub> atmosféry. Následně byly buňky mikroskopicky prohlíženy a hodnoceny (Nikon Eclipse E400 Nikon, (Praha, Česká republika)) Vlastní detekce senescentních ( $\beta$ -galaktosidáza pozitivních) buněk proběhla počítačově pomocí programu NIS Elements AR 3.20. Hodnocení proběhlo minimálně u 5 000 buněk.

5.4.18 Příprava lyzátů a imunobloting: Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v kultivačních lahvích byly převedeny do suspenze trypsinizací a centrifugací. K získání buněčných lyzátů byl pelet byl resuspendován v ledově studeném lyzačním pufru (137 mmol NaCl, 10% glycerol, 1% n-octyl- $\beta$ -D-glukopyranosid, 50 mmol NaF, 20 mmol Tris, 1 mmol ortovanadatan sodný, Complete TMMini) s přídavkem digitoninu. Lyzozomální frakce byla z buněčné suspenze získána pomocí isolačního kitu LYSIS01 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Spojené Státy Americké). Buňky byly resuspendovány v extrakčním pufru a na ledu homogenizovány pasírováním stříkačkou přes tenkou injekční jehlu. Jaderná frakce byla odstraněna centrifugací (20.000 G, 20 minut). Pelet s lyzozomy byl resuspendován v extrakčním pufru a opět centrifugován (20.000 G, 60 minut).

Buněčné lyzáty a lyzozomální frakce byly vařeny po 5 minut při 95 °C v SDS vzorkovacím pufru (Tris-HCl pH 6,81, 2-merkaptotanol, 10% glycerol, SDS, 0,1% bromfenolová modř) a pipetovány do 12% SDS/polyakrylamidového gelu. Každý vzorek obsahoval stejné množství proteinu (30  $\mu$ g), což bylo potvrzeno BCA esejí. Po elektroforéze byly proteiny v gelu převedeny na PVDF (polyvinidilin fluorid) membránu (100 V, 60 min) a inkubovány při 25 °C po dobu 1,5 hodiny s blokovacím roztokem (5% sušené mléko, 10mmol Tris-HCl (pH 8,0), 150mM chlorid sodný a 0,1% Tween 20. Membrány byly následně inkubovány s primárními protilátkami (monoklonální králičí anti-LC3, 1:600, monoklonální králičí anti-Beclin-1, 1:500, monoklonální králičí anti-Lamp-1, 1:800, polyklonální králičí anti-Bax, 1:500, monoklonální myší anti-p62, 1:1000, monoklonální myší anti-TP53, 1:1000, monoklonální králičí anti-phospho Ser-139 H2A.X, monoklonální králičí anti-Cox-IV, 1:600, monoklonální myší anti- $\beta$ -aktin, 1:100) přes noc při 4 °C. Následně byly vzorky pětikrát na 5 minut omyty TBST. Po inkubaci se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (1:1000, 1 hodina, 25 °C) následoval oplach TBST a detekce protein-specifického signálu chemiluminiscenčním kitem dle návodu výrobce firmy Boehringer Mannheim-Roche (Basilej, Švýcarsko). Jako kontrola byl použit  $\beta$ -aktin. Intenzita protein-specifického signálu byla ověřena pomocí GelQuant software 2.7 firmy DNR Bio-Imaging Systems (Jeruzalém, Izrael).

5.4.19 RNA interference: Buňky byly v 6jamkových inkubačních destičkách kultivovány v médiu bez přídavku antibiotik k dosažení 75% konfluence. Následně byla v těchto jamkách provedena transfekce přidáním specifických kationických lipidů obsahujících siRNA pro jednotlivé geny (*P16*, *TP53*, *BAX* siRNAs Transfection Kit, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

(Santa Cruz, Kalifornie, Spojené Státy Americké); P38 SignalSilence® Pool siRNA Kit, Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts, Spojené Státy Americké)). Po 8 hodinách inkubace při 37 °C byl přidán 1ml čerstvého kultivačního média a pokračováno v inkubaci za stejných podmínek dalších 24 hodin. Buňky byly následně vystaveny CPT-11 a analyzovány 48 hodin po poslední siRNA transfekci. Paralelně byly připraveny negativní kontroly transfekce (scrambled siRNA sekvence). Vyřazení genu bylo ověřeno imunoblotem, výsledky byly normalizovány dle kontroly.

5.4.20 Exprese microRNA: Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky v kultivačních lahvích byly převedeny do suspenze trypsinizací, centrifugací a resuspendací. MicroRNA byla izolována z těchto suspenzí pomocí kitu mirVana 344™ miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems (Praha, Česká republika)). Pro analýzu zralých miR-34a, miR-128a a miR-449a a RNU44 byly použity specifické kity s primery TaqMan.347 (Applied Biosystems (Praha, Česká republika)). Reakce pro každý vzorek (45 cyklů) byla provedena v objemu 20 µl užitím 1 µl cDNA na cykléru LightCycler 1.5 (Roche (Praha, Česká republika)) dle následujících reakčních podmínek: 50 °C (1.5 min), 96 °C (10 min), 95 °C (15s), 60 °C (1.5 min). Malá jadéřková RNA RNU44 byla použita jako vnitřní kontrola a byla amplifikována pro všechny vzorky za stejných reakčních podmínek. Reakce s každým vzorkem byla opakována aspoň 4x. Změna exprese miRNA byla vyjádřena dle metody  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen 2001). Získaná data byla vyjádřena jako změna exprese miRNA ovlivněných buněk v daném časovém intervalu vzhledem k neovlivněné kontrole po normalizaci k RNU44.

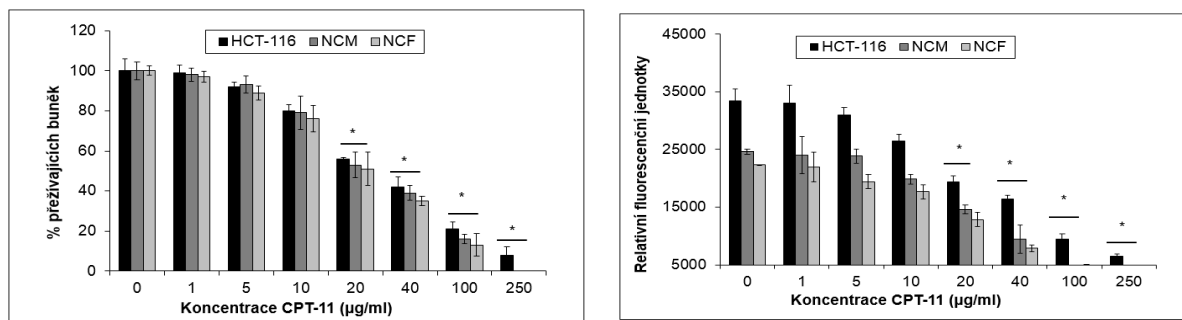
5.5 Statistická analýza: Byla provedena v programu GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornie, USA). Byla použita analýza variance jednoduchého třídění (one-way Anova) s Dunnetovým testem mnohonásobných porovnání *post hoc*. Výsledky byly srovnávány s kontrolou a průměry byly považovány za významné při  $p < 0,05$ . Všechny experimenty byly kvůli biologické variabilitě opakovány minimálně 3x.

## 6. Výsledky

6.1. Vliv CPT-11 na růstové parametry nádorových i nenádorových střevních buněk  
V úvodní části naší práce jsme nejprve obecně ověřili základní citlivost buněk vybrané nádorové linie CRC (HCT-116) k CPT-11, a to prostřednictvím hodnocení jeho vlivu na jejich růst, viabilitu a proliferaci. Vzhledem k tomu, že při léčbě tímto chemoterapeutikem jsou v reálné klinické praxi ovlivněny i nenádorové buněčné populace střeva, zaměřovali jsme naši pozornost zejména na normální buňky vyskytující se v tlustém střevu. V tomto případě se jednalo o modelové buněčné linie NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová). Výše uvedené parametry citlivosti buněk k CPT-11 jsme stanovili prostřednictvím testu metabolické aktivity (WST-1) a komplementárního testu DNA syntézy (inkorporace bromdeoxyuridinu -BrdU). V daném časovém intervalu hodnocení (48 h) CPT-11 inhiboval růst a viabilitu všech testovaných linií (nádorové i nenádorových), a to v závislosti na použité koncentraci. Nejnižší koncentrace CPT-11, která významně inhibovala buněčný růst a viabilitu u všech testovaných buněk, byla 20 µg/ml, i když již pro koncentraci 10 µg/ml byl pozorovatelný znatelný, byť statisticky nevýznamný pokles. Zatímco citlivost obou použitých

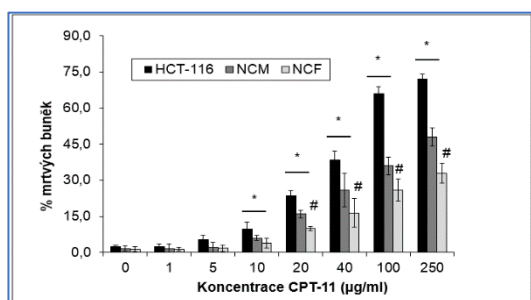


testů pro hodnocení cytotoxicity CPT-11 na CRC linii HCT-116 byla shodná, v případě linií NCM a NCF se jako citlivější ukázal test DNA syntézy (Obr. 6A, B).

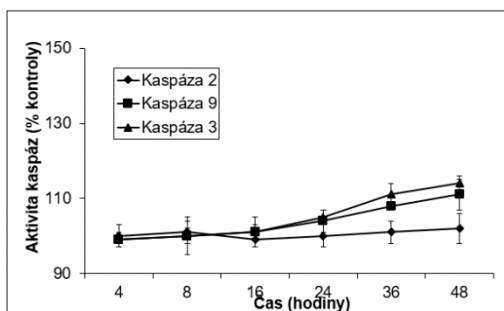


Obr. 6: Proliferace a viabilita linie kolorektálního karcinomu HCT-116 a nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) po podání irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-250 µg/ml a v časovém intervalu 48 hodin. (A) Test metabolické aktivity WST-1, (B) DNA syntéza. \*P< v porovnání s neovlivněnými kontrolní buňkami ve stejném časovém intervalu

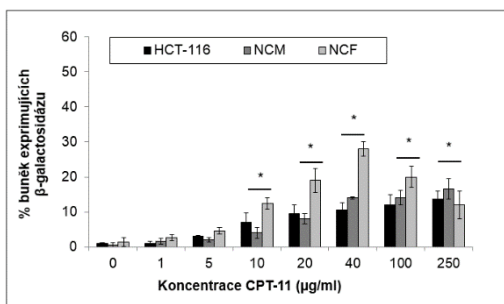
6.2. Vliv CPT-11 na buněčnou smrt/senescenci: CPT-11 vyvolaná cytotoxicita u testovaných linií byla významně spojena s navozením buněčné smrti u všech tří linií. Její úroveň však byla závislá na použité koncentraci této látky a lišila se i mezi jednotlivými buněčnými populacemi. Množství mrtvých (umírajících) buněk bylo signifikantně zvýšeno již při koncentraci 10 µg/ml CPT-11, a to u všech sledovaných linií. Se zvyšujícími se koncentracemi CPT-11 narůstalo i množství mrtvých buněk, nicméně nejcitlivější vždy byla linie HCT-116, nejméně potom linie NCF (Obr. 7). V následných testech jsme pak ověřili základní charakteristiky této buněčné smrti, a to prostřednictvím měření aktivity kaspázy-2, -9 a -3. U buněk linie HCT-116 vzrostla aktivita všech kaspáz významně již v intervalu 16-24 hodin od začátku ovlivnění CPT-11 a do konce sledování neustále stoupala. Podobný trend byl zaznamenán i u buněk linie NCM, avšak s výrazně nižší a časově oddálenější dynamikou. Naopak, u ovlivněné linie NCF nebyla aktivita všech sledovaných kaspáz v průběhu celého experimentu významně zvýšena (Obr. 8 A, B a C). Na základě těchto výsledků i některých morfologických pozorování byla následně u testovaných linií ovlivněných CPT-11 stanovena přítomnost β-galaktosidázy, markeru senescence. Jak je ukázáno na Obr. 9, pozitivita na β-galaktosidázu se u všech linií zvyšovala již od ovlivnění CPT-11 v koncentraci 10 µg/ml, a to nejvíce u linie NCF, přičemž maxima bylo dosaženo při koncentraci 40 µg/ml, kdy až 30 % ovlivněných NCF buněk vykazovalo senescentní fenotyp. Prosenescentní účinek CPT-11 u NCF buněk dále koreloval i se změnami (snížením) metylace DNA, a to již při necytotoxické koncentraci 5 µg/ml CPT-11 (Obr. 10), a zvýšením buněčné adhezivity u téže linie, významné nicméně až při vyšších CPT-11 koncentracích (Obr. 11).



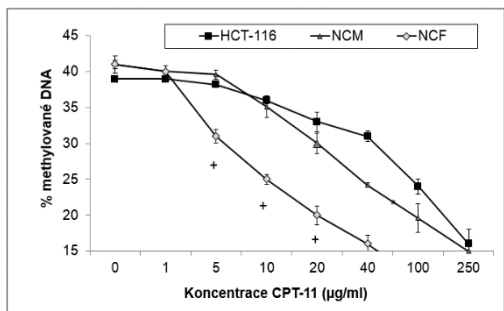
Obr.7: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-250 µg/ml na buněčnou smrt linie kolorektálního karcinomu HCT-116 a nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami ve stejném časovém intervalu, #P< 0,05 v porovnání s buňkami linie HCT-116 ve stejném časovém intervalu



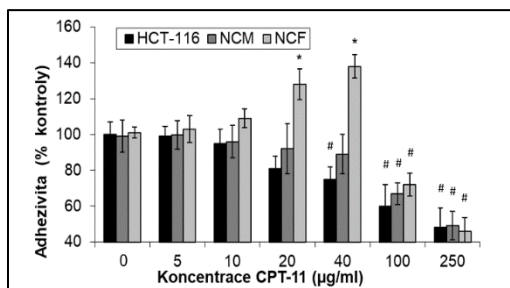
Obr. 8: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml na aktivitu kaspázy-2, -9 a -3 u buněk linie kolorektálního karcinomu HCT-116 (A) a nenádorových linií NCM (epitelová) (B) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) (C) v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s počátkem ovlivnění



Obr. 9: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-250 µg/ml na expresi β-galaktosidázy u buněk linie kolorektálního karcinomu HCT-116 a nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami ve stejném časovém intervalu



Obr. 10: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-250 µg/ml na změnu metylace DNA u buněk linie kolorektálního karcinomu HCT-116 a nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) v časovém intervalu 48 hodin. +P< 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami ve stejném časovém intervalu



Obr. 11: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-250 µg/ml na změnu adhezivitu buněk linie kolorektálního karcinomu HCT-116 a nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 nárůst v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami ve stejném časovém intervalu, #P< 0,05 pokles v porovnání s neovlivněnými kontrolními

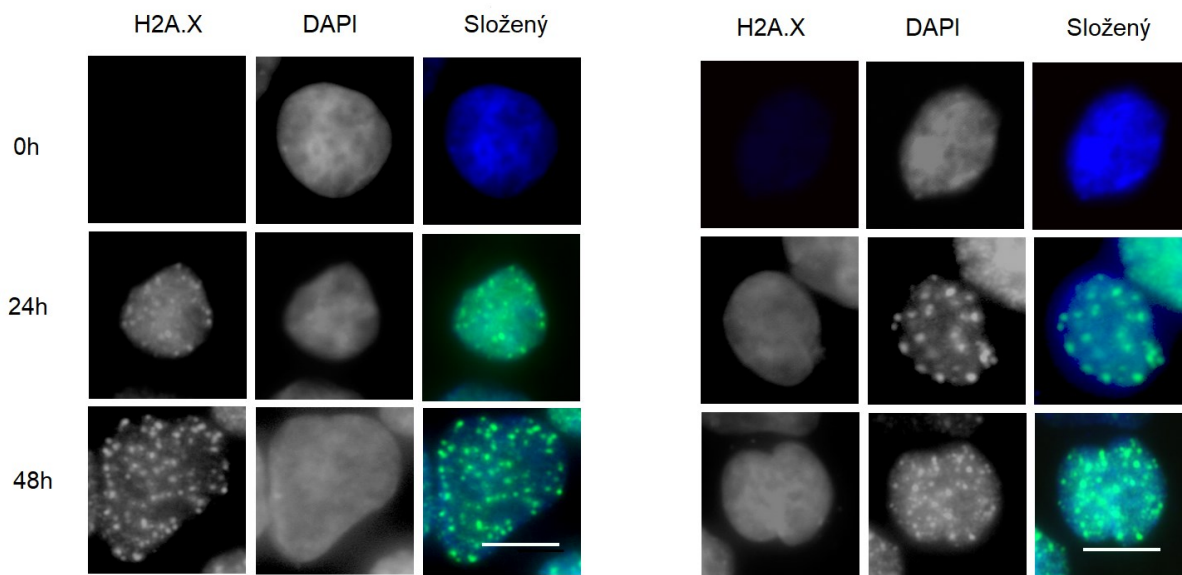
buňkami ve stejném časovém intervalu

### 6.3 Vliv CPT-11 na poškození DNA a specifickou signalizaci

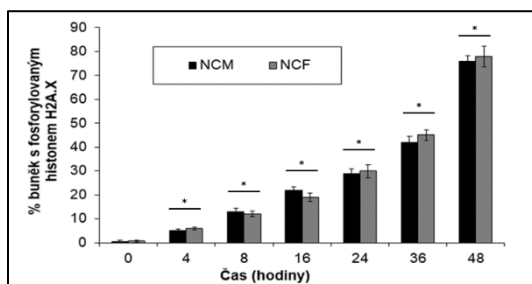
Výsledky předcházejících experimentů naznačily, že v rámci použitého koncentračního rozmezí a v časovém intervalu 48 hodin CPT-11 stimuluje výrazně odlišné typy buněčných odpovědí, a to v závislosti na použitém buněčném modelu. Obzvláště zajímavými se jeví rozdíly u nenádorových linií (NCM – navozená buněčná smrt apoptóza a NCF – výrazný podíl senescentního fenotypu), a to s i ohledem na jejich možné navození v reálné klinické praxi s následným rozvojem specifických nežádoucích účinků. Proto jsme se v další části práce pokusili objasnit důvod těchto rozdílů pomocí bližší charakterizace mechanismů, kterými CPT-11 v těchto modelech navozuje výše zmíněné odpovědi. Nejnižší cytotoxická

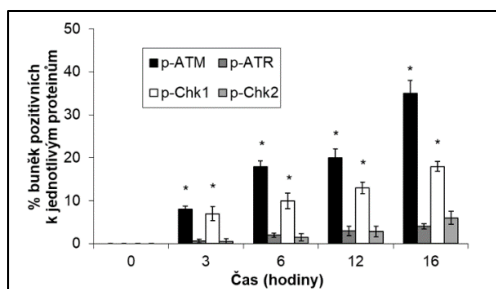
koncentrace CPT-11 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) vyvolala u obou linií časově závislý vznik dvouvláknových zlomů v DNA. Ty se prezentovaly jako H2A.X imunofluorescenčně pozitivní ložiska v buněčném jádře (Obr. 12), jejichž počet dosáhl maxima 48 hodin po ovlivnění a byl u obou testovaných linií téměř shodný (Obr. 13). U takto poškozených buněk byly časně aktivovány specifické buněčné senzory DNA poškození (cca 3 hodiny od ovlivnění), a to kinázy ATM, ATR, Chk1 a Chk2. Nejvýznamnější nárůst aktivace byl zaznamenán u ATM a Chk1 kináz, které detekují dvouvláknové zlomy, zatímco aktivace ATR a Chk2 kináz (detekují jednovláknové zlomy) byla významně nižší, a to opět téměř shodně u obou testovaných linií (Obr. 14 a 15). V obou liniích byla dále zaznamenána přítomnost aktivované MAPK kinázy p38, která se uplatňuje při stresové odpovědi buňky na různé stimuly včetně poškození DNA. U NCM buněk došlo po ovlivnění CPT-11 k brzké aktivaci této kinázy (4 hodiny), přičemž jejího maxima bylo dosaženo po 12 hodinách od ovlivnění, s následným pozvolným poklesem. Naopak, aktivita této kinázy u ovlivněných buněk NCF narůstala pouze pozvolna a její dosažený vrchol (24 hodin od ovlivnění) byl výrazně nižší než u buněk NCM (Obr. 16).

Obr. 12: Poškození DNA vizualizované prostřednictvím H2A.X pozitivních fluorescenčních ložisek v jádře buněk nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) během 48 hodin po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ . Fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 600x. Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .

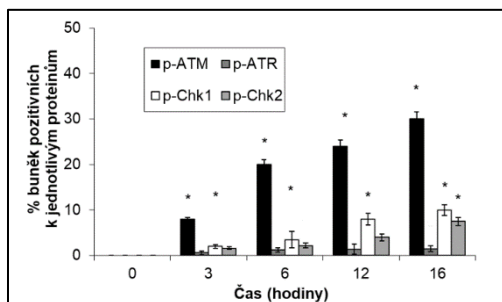


Obr. 13: Počty buněk s jádrem pozitivním na H2A.X ložiska u nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) ovlivněných 20  $\mu\text{g/ml}$  irinotekanu (CPT-11) v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění

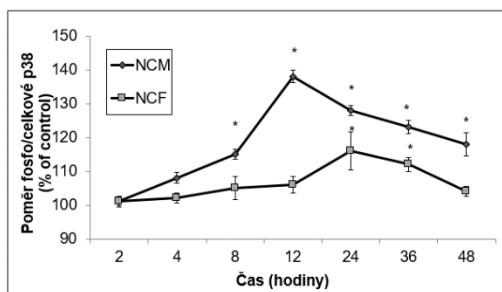




Obr. 14: Časový průběh aktivace kináz ATM, ATR, Chk1 a Chk2 po ovlivnění nenádorové linie NCM (epitelová) irinotekanem (CPT-11) v dávce 20  $\mu\text{g/ml}$  v průběhu 16 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění



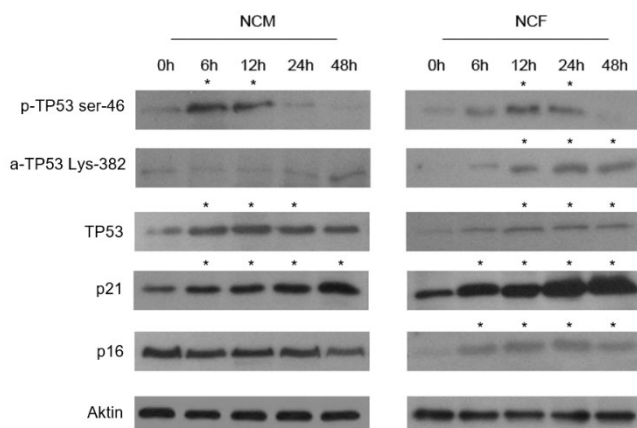
Obr. 15: Časový průběh aktivace kináz ATM, ATR, Chk1 a Chk2 po ovlivnění nenádorové linie NCF (mesenchymální – fibroblastová) irinotekanem (CPT-11) v dávce 20  $\mu\text{g/ml}$  v průběhu 16 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění



Obr. 16: Časový průběh aktivace MAPK kinázy p38 u nenádorových buněčných linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) ovlivněných irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  během 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění

## 6.4 Vliv CPT-11 na expresi proteinů TP53 a p16

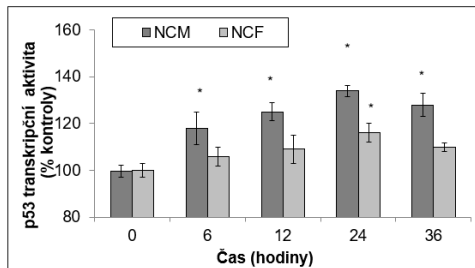
CPT-11 vyvolal u obou testovaných nenádorových linií poškození DNA, které aktivovalo specifickou nitrobuněčnou signalizaci vedoucí k odlišným projevům ve smyslu apoptózy a senescence. Z tohoto důvodu se cílem dalšího výzkumu se stala aktivita a exprese klíčových mediátorů těchto procesů, tj. proteinů TP53 a p16. Analýzy přítomnosti obou těchto proteinů stejně tak jako proteinu p21 (přímo podléhajícího TP53) prostřednictvím imunoblotování prokázaly významné odlišnosti v úrovni jejich exprese či aktivity u obou testovaných linií (obr. 17). U linie NCM byla pozorována zvyšující se exprese TP53 již po 6 hodinách od ovlivnění, která dosáhla maxima 12 hodin po ovlivnění, a to spolu s jeho specifickou fosforylací na pozici Ser-46, avšak statisticky nesignifikantní acetylací na pozici Lys-382. Zároveň v buňkách stoupalo množství proteinu p21, které dosáhlo maxima na konci celého experimentu. Naopak, množství proteinu p16 se v ovlivněných buňkách trvale snižovalo.



U linie NCF vyvolal CPT-11 opět zvýšení exprese TP53, avšak méně výrazně ve srovnání s buňkami NCM. Fosforylace TP53 na pozici Ser-46 se také zvyšovala, nicméně významného nárůstu dosáhla (spolu s acetylací na pozici Lys-382) až 12 hodin po ovlivnění. CPT-11 vyvolal trvalý nárůst exprese proteinu p16 (obr. 17). Kromě nárůstu množství proteinu TP53 u obou testovaných nenádorových linií se po ovlivnění CPT-11 zvyšovala i

vlastní transkripční aktivita *TP53* genu, a to opět v časové závislosti a v odlišné intenzitě. Ta byla vždy vyšší u buněk NCM (Obr. 18).

Obr. 17: Časový průběh exprese vybraných proteinů účastnících se intracelulární stresové signalizace u nenádorových buněk linie NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) ovlivněných irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  během 48 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty byly denzitometricky analyzovány a  $*P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění

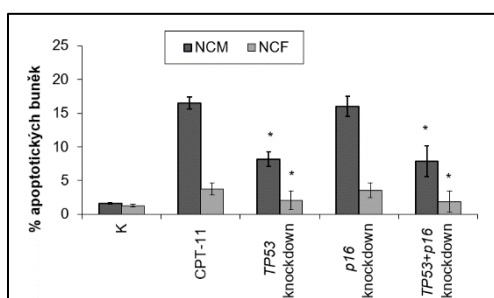


Obr. 18: Časový průběh změn v transkripční aktivitě *TP53* u nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) ovlivněných irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  během 36 hodin.  $*P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění

## 6.5 Úloha proteinů *TP53* a *p16* na CPT-11 vyvolanou apoptózu a senescenci

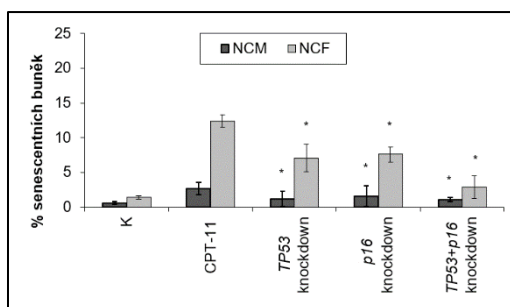
Pro mechanistické ověření úlohy a významu proteinů *TP53* a *p16* v CPT-11 navozené intracelulární stresové signalizaci a následné apoptóze/senescenci byla exprese příslušných genů umlčena metodou RNA interference (siRNA-genový knockdown). V úvodu jsme nejprve ověřili účinnost umlčení obou genů pomocí imunoblotingu. Výsledky prezentované na Obr. 19 ukazují, že v obou případech bylo dosaženo signifikantního úbytku exprese příslušných proteinů u obou dvou linií. Potlačení exprese genu *TP53* vedlo u obou buněčných linií k významnému potlačení navozené úrovně apoptózy, zatímco snížení exprese *p16* se v tomto ohledu ukázalo jako nevýznamné (Obr. 20). Naproti tomu CPT-11 stimulovaná senescence byla významně ovlivněna ve smyslu své redukce při snížení exprese jednotlivých cílených genů, a to u obou testovaných linií (NCM a NCF). Současné umlčení obou dvou genů pak u linie NCF vedlo k další inhibici senescence – celkově se počet senescenčních buněk snížil až na úroveň pod 3 %, zatímco u buněk linie NCM nebyla tato akcelerace inhibice senescence pozorována (Obr. 21).

Obr. 19: Efekt umlčení exprese (knockdown) genů *TP53* a/nebo *p16* pomocí siRNA u nenádorových buněčných linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová). Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty byly denzitometricky analyzovány a  $*P < 0,05$  v porovnání s neovlivněnými buňkami



Obr. 20: Efekt umlčení exprese (knockdown) genů *TP53* a/nebo *p16* pomocí siRNA u nenádorových buněčných linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) na přítomnost apoptózy vyvolané irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  v intervalu 48 hodin.  $*P < 0,05$  v porovnání s buňkami ovlivněnými CPT-11 ve stejné koncentraci a ve stejném časovém intervalu

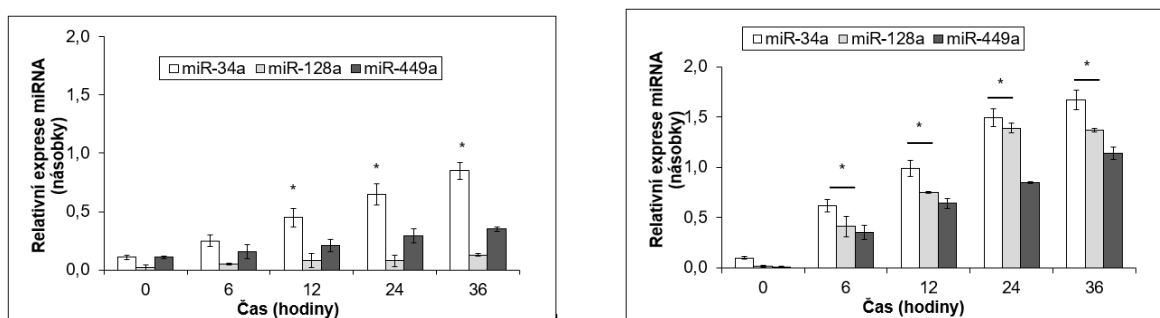




Obr. 21: Efekt umlčení exprese (knockdown) genů *TP53* a/nebo *p16* pomocí siRNA u nenádorových buněčných linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) na přítomnost senescence vyvolané irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  v intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s buňkami ovlivněnými CPT-11 ve stejné koncentraci a ve stejném časovém intervalu

## 6.6 Expresa vybraných miRNA u buněk ovlivněných CPT-11

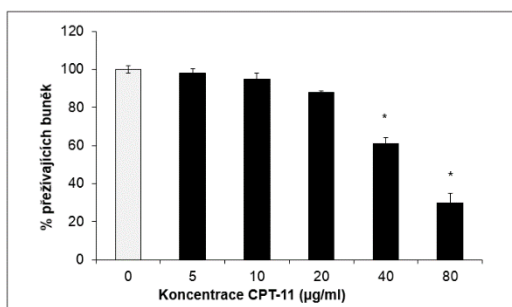
S ohledem na současný stav znalostí mechanismů zapojených do intracelulárních stresových signalizací jsme u NCM a NCF buněk vystavených CPT-11 v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ , kromě již proběhlých analýz, zkoumali expresi vybraných miRNA (miRNA-34a, miRNA-128a, miRNA-449a) známých ze zapojení do tohoto procesu. U linie NCM došlo k časově závislému trvalému nárůstu exprese všech sledovaných miRNA, i když pouze u miRNA-34a se jednalo o signifikantní zvýšení, a to od 12 hodin ovlivnění CPT-11 s vrcholem po 36 hodinách. Oproti tomu u linie NCF byla zaznamenána masivně zvýšená exprese všech sledovaných miRNA, a to již po 6 hodinách od ovlivnění CPT-11. I v tomto případě byla nejvíce zvýšená hladina miRNA-34a (Obr. 22).



Obr. 22: Časový průběh vybraných miRNA zapojených do procesu senescence během 36 hodin ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  u nenádorových buněčných linií (A) NCM (epitelová) a (B) NCF (mesenchymální – fibroblastová). \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění CPT-11

## 6.7 Vliv CPT-11 na růstové parametry a viabilitu nádorových střevních buněk s mutovaným *TP53*

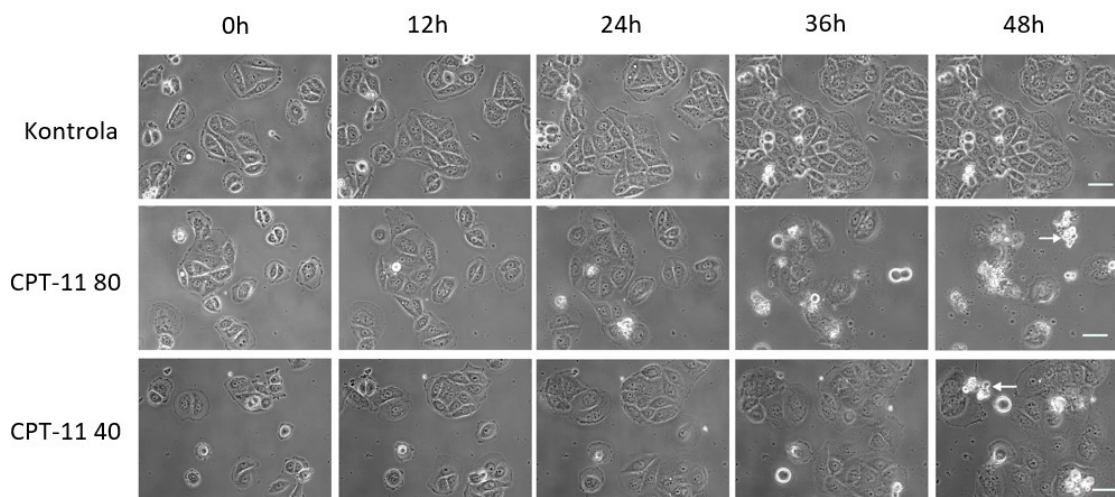
Z dosavadních výsledků vyplynul klíčový vliv proteinu TP53 v buněčné odpovědi na stres vyvolaný CPT-11. Protože buňky CRC v pokročilém stádiu nesou mutace v tomto tumor supresorovém genu, pro další pokusy jsme zvolili nádorovou linii SW-620, jejíž buňky byly původně odebrané z uzlinové metastázy CRC a které jsou pozitivní pro některé mutace – zejména v genu *TP53*. Vliv CPT-11 na růstové parametry a viabilitu byl určen opět pomocí testu metabolické aktivity (WST-1) korelovaného na množství celkového proteinu (test Coomassie Brilliant Blue). V časovém intervalu 48 hodin jsme pozorovali koncentračně závislé snížení buněčného růstu a viability, přičemž první statisticky významný cytotoxický účinek použité látky CPT-11 se projevil v koncentraci 40  $\mu\text{g/ml}$  (Obr. 23). Tato koncentrace byla tedy zvolena jako výchozí pro další testování.



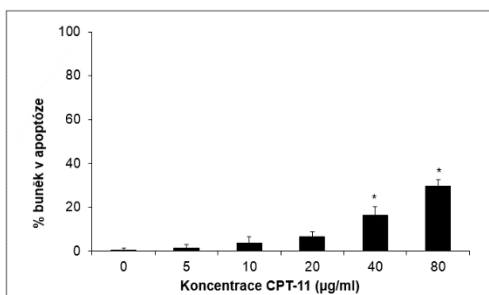
Obr. 23: Proliferace a viabilita linie kolorektálního karcinomu SW-620 v koncentračním rozmezí 0-80 µg/ml a v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolní buňkami ve stejném časovém intervalu

### 6.8 Vliv CPT-11 na buněčnou smrt – apoptózu u nádorových střevních buněk s mutovaným *TP53*

U CPT-11 ovlivněných buněk byla mikroskopicky pozorována nižší proliferace a morfologické změny zahrnující buněčné smršťování, ztrátu adherence a tvorbu membránových protruzí – blebů s následným rozpadem buněk (Obr. 24). Přítomnost umírajících buněk v kulturách vystavených CPT-11 byla dále kvantifikována cytometricky (Obr. 25), přičemž jejich další pozorované morfologické i biochemické znaky zahrnovaly specifickou kondenzaci a fragmentaci chromatinu (Obr. 26), časově závislou ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu (MMP – Obr. 27), uvolňování cytochromu c do cytoplazmy (Obr. 28) a aktivaci kaspázy-3 (Obr. 29).



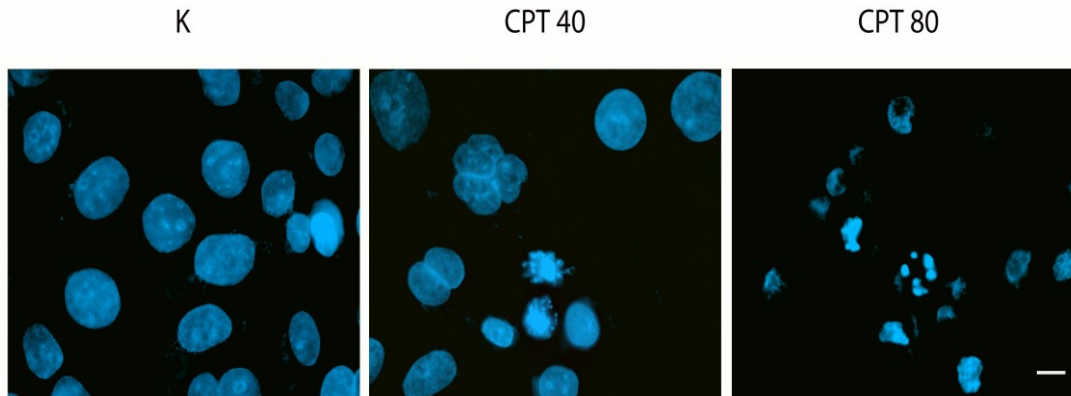
Obr. 24: Časový průběh proliferace a morfologických změn buněk u linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po podání irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml a v časovém intervalu 48 hodin. Fázově kontrastní mikroskopie. Zvětšení 600x. Měřítko 10 µm



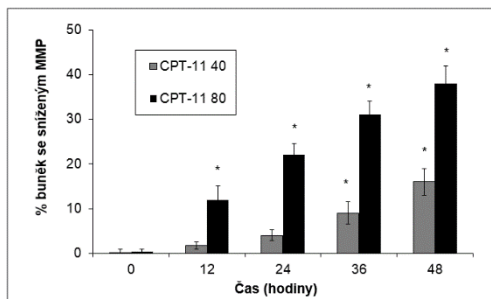
Obr. 25: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-80 µg/ml a v časovém intervalu 48 hodin na apoptózu u buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620. \*P< 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolní buňkami ve stejném časovém intervalu



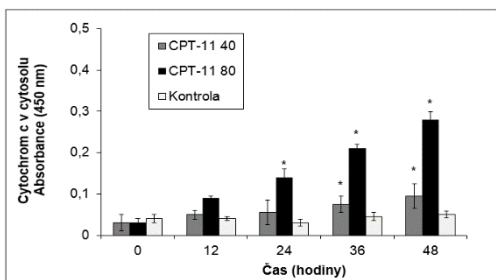




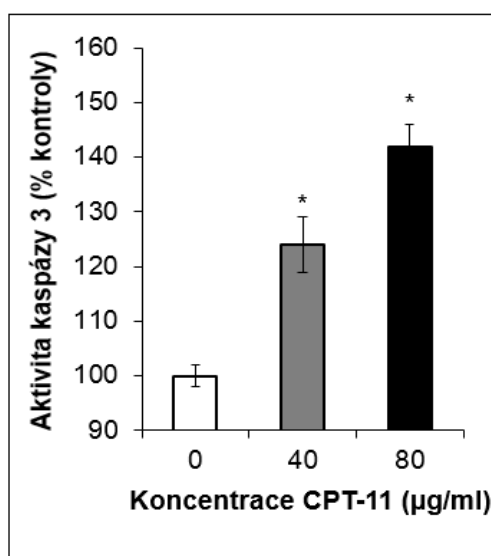
Obr. 26: Změny struktury jader buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml v časovém intervalu 48 hodin. Fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 600x. Měřítka 10 µm.



Obr. 27: Časové změny mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml. \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění



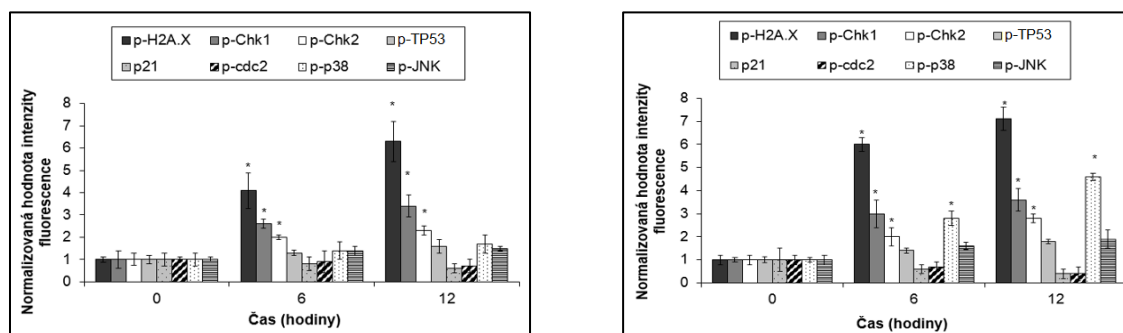
Obr. 28: Uvolňování mitochondriálního cytochromu c do cytoplazmy buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu



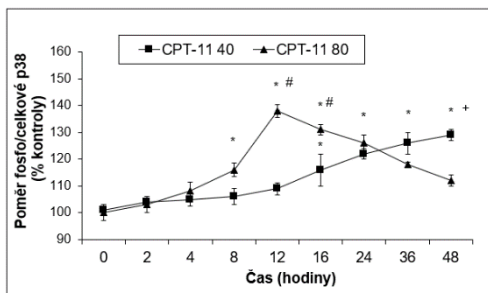
Obr. 29: Aktivace kaspázy-3 u buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu

## 6.9 Vliv CPT-11 na specifickou intracelulární signalizaci nádorových střevních buněk s mutovaným *TP53*

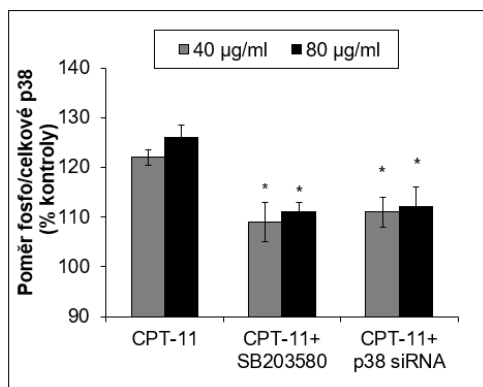
Vzhledem k tomu, že CPT-11 vyvolával buněčnou smrt – apoptózu, v další části našich studií jsme se podrobněji zaměřili na zapojení vybraných signálních stresových drah, a to prostřednictvím sledování aktivace klíčových elementů těchto drah. Buněky linie SW-620 vykazovaly po ovlivnění CPT-11 v dávce 40  $\mu\text{l/ml}$  poměrně časnou (6–12 hodin) zvýšenou expresi jednak histonu H2A.X a jednak kináz Chk1 a Chk2. Na druhé straně exprese a aktivace ostatních sledovaných markerů jakými byly p-TP53, p38, cdc2 či p21 a JNK zůstaly nesignifikantní (obr. 30 A). Při použití vyšší koncentrace CPT-11 (80  $\mu\text{l/ml}$ ), byl profil aktivace sledovaných markerů podobný, pouze úroveň jejich aktivace byla vyšší. Dále se ale též zvýšila exprese MAPK kinázy p38. Změny v ostatních markerech v rámci sledovaného časového rámce byly pouze minimální a statisticky nesignifikantní (obr. 30 B). Vzhledem ke zjištěné aktivaci kinázy p38, byla její úloha dále podrobněji zkoumána pomocí metody ELISA, a to v průběhu celých 48 hodin. Výsledky prokázaly odlišný časový profil aktivity této kinázy v závislosti na použité koncentraci CPT-11, kdy u buněk SW-620 ovlivněných 40  $\mu\text{g/ml}$  CPT-11 tato aktivita pozvolna narůstala a dosáhla významných hodnot v intervalu 36–48 hodin. Naproti tomu CPT v koncentraci 80  $\mu\text{g/ml}$  vyvolal významný a rychlý nárůst aktivity p38 již po 12 hodinách expozice s následným poklesem do prakticky výchozích hodnot (Obr. 31). Abychom prokázali přímý vliv kinázy p38 na apoptózu buněk SW-620 ovlivněných CPT-11, přistoupili jsme k cílené inhibici tohoto proteinu, a to prostřednictvím specifického chemického inhibitoru p38 SB203580 a/či pomocí genového utišení exprese (siRNA). Obě dvě metody prokázaly v experimentu schopnost statisticky významně snížit aktivitu p38 u této buněčné linie (Obr. 32). Chemická i genová inhibice kinázy p38 u buněk linie SW-620 ovlivněné CPT-11 v koncentraci 40  $\mu\text{g/ml}$  významně zvýšilo úroveň apoptózy ve všech sledovaných časových intervalech (Obr. 33 A). Naproti tomu u buněk ovlivněných CPT-11 v koncentraci 80  $\mu\text{g/ml}$  došlo za stejných podmínek k opačnému jevu; tj. k signifikantnímu snížení úrovně apoptózy, a to opět ve všech sledovaných časových intervalech (obr. 33 B).



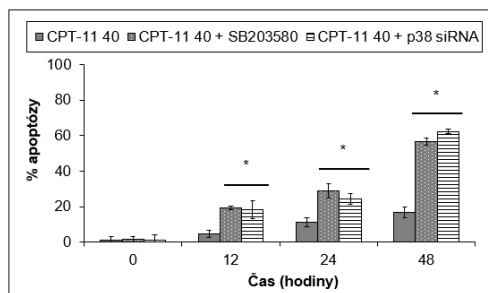
Obr. 30: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci (A) 40  $\mu\text{g/ml}$  a (B) 80  $\mu\text{g/ml}$  na aktivaci vybraných markerů signálních stresových drah u buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 v časovém intervalu 12 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění



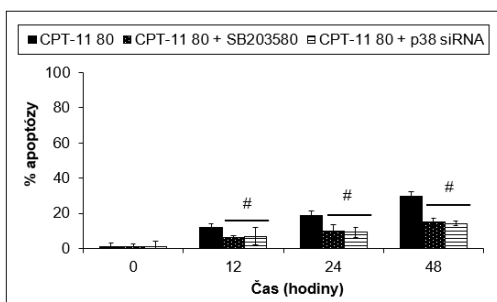
Obr. 31: Aktivita MAP kinázy p38 u buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání počátkem ovlivnění, # $P < 0,05$  v porovnání s buňkami ovlivněnými CPT-11 v koncentraci 80 µg/ml ve stejný časový interval, + $P < 0,05$  v porovnání s buňkami ovlivněnými CPT-11 v koncentraci 40 µg/ml ve stejný časový interval



Obr. 32: Snížení aktivity MAPK kinázy p38 prostřednictvím specifického chemického inhibitoru SB203580 a/či genového utišení exprese (siRNA) u buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s buňkami ovlivněnými CPT-11 ve stejný časový interval



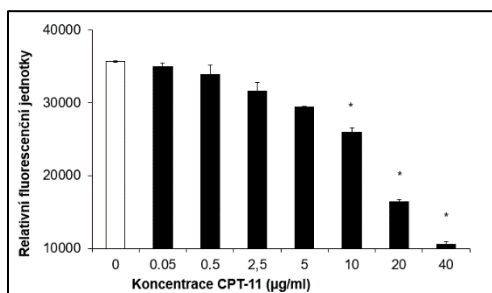
Obr. 33: Vliv inhibice MAPK kinázy p38 (chemický inhibitor SB203580 a siRNA) na apoptózu buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci (A) 40 a (B) 80 µg/ml v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s buňkami ovlivněnými CPT-11 v koncentraci 40 µg/ml ve stejný časový interval, # $P < 0,05$  v porovnání s buňkami ovlivněnými CPT-11 v koncentraci 80 µg/ml ve stejný časový interval



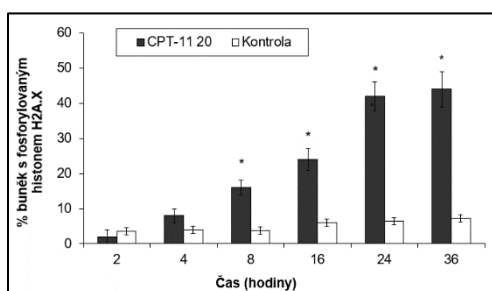
## 6.10 Vliv CPT-11 na růstové parametry nádorových střevních buněk s odstraněným *TP53*

Výsledky předchozích experimentů jasně prokázaly, že funkční status genu (proteinu) *TP53* hraje při odpovědi nádorových střevních buněk na CPT-11 významnou úlohu. V poslední části našich experimentů jsme proto chtěli ověřit chování buněk CRC u kterých došlo k delecí genu *TP53*, a to zejména s ohledem na jejich citlivost vůči CPT-11. Jako model jsme použili buněčnou linii, ve které byl gen *TP53* uměle odstraněn genovým knockoutem (HCT-116-*TP53*KO). CPT-11 v časovém intervalu 48 hodin opět prokázal cytotoxický a antiproliferační účinek, který byl významný již od použité koncentrace 10 µg/ml, jak bylo prokázáno testem syntézy DNA. K dalším experimentům byla vybrána koncentrace 20 µg/ml jejíž cytotoxicita se pohybovala pod úrovní hodnoty  $IC_{50}$  (Obr. 34). CPT-11 v této koncentraci vyvolával poškození DNA, které významně narůstalo již v intervalu 4–8 hodin od ovlivnění

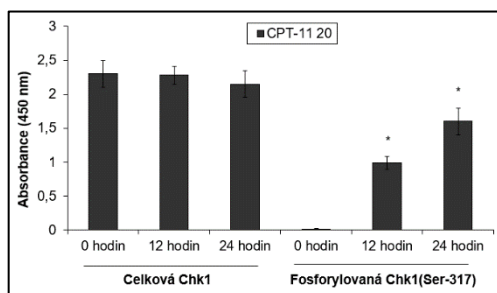
s dosaženým maximem buněk pozitivních na dvouvláknové zlomy (cca 45 %) v intervalu 24-36 hodin od ovlivnění (Obr. 35). Toto poškození vyvolalo standardní buněčnou odpověď v podobě aktivace stresové kinázy Chk1, která časově odpovídala nárůstu DNA poškození u ovlivněných buněk (Obr. 36).



Obr. 34: Proliferace a viabilita linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po podání irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-40 µg/ml a v časovém intervalu 48 hodin stanovená prostřednictvím testu DNA syntézy. \*P< 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami ve stejném časovém intervalu



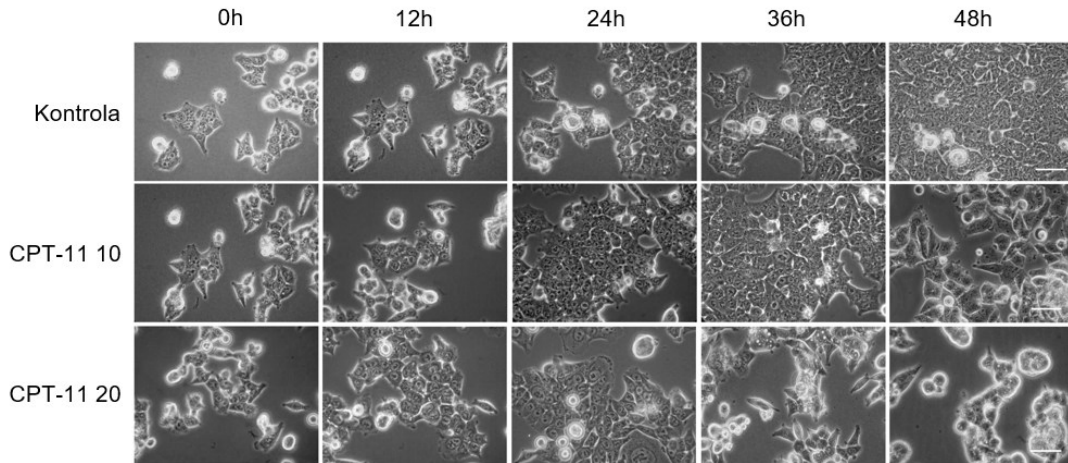
Obr. 35: Počty buněk s jádrem pozitivním na H2A.X ložiska u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po podání irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml a v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami ve stejném časovém intervalu



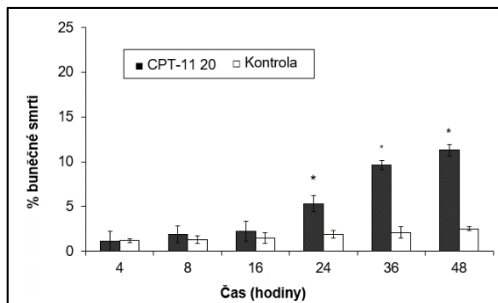
Obr. 36: Časový průběh aktivace stresové kinázy Chk1 u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po podání irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml a v časovém intervalu 24 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s počátkem ovlivnění

### 6.11 Vliv CPT-11 na buněčnou smrt-apoptózu u nádorových střevních buněk s odstraněným *TP53*

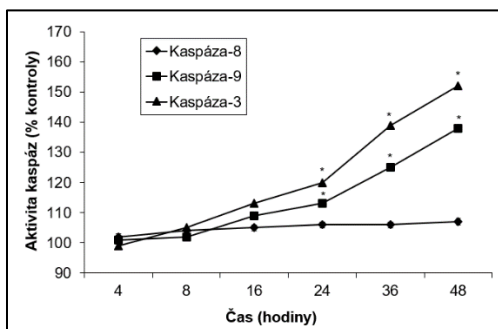
Oproti kontrolním kulturám, byla u CPT-11 ovlivněných buněk mikroskopicky pozorována nižší proliferace a morfologické změny zahrnující cytoplazmatickou vakuolizaci, buněčné smršťování, ztrátu adherence a tvorbu membránových protruzí – blebů (Obr. 37). Přítomnost indukované apoptózy u ovlivněných buněk byla následně potvrzena cytometricky, přičemž časosběrné studie dále specifikovaly její dynamiku. Ta byla nejprve během prvních 20 hodin ovlivnění dosti pozvolná a k významnému nárůstu počtu apoptotických buněk ve sledovaných kulturách došlo až od 24 hodin ovlivnění a výše (Obr. 38). Tato buněčná smrt probíhala prostřednictvím aktivovaných kaspáz-9 a -3, ale v nepřítomnosti kaspázy-8 (Obr. 39). Pokusy s frakcionací buněk dále specifikovaly, že do procesu aktivované apoptotické signalizace indukované CPT-11 se u testovaného modelu zapojovaly i mitochondrie, a to přímým uvolňováním cytochromu c do cytoplazmy (Obr. 40).



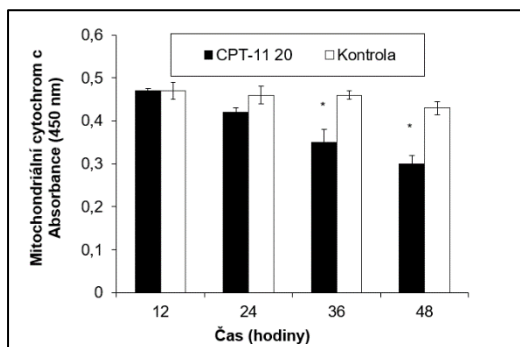
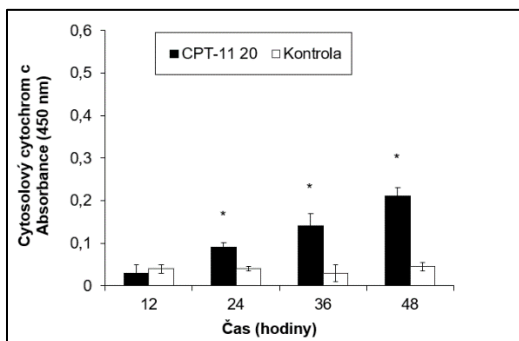
Obr. 37: Časový průběh proliferace a morfologických změn buněk u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po podání irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 10 a 20  $\mu\text{g/ml}$  a v časovém intervalu 48 hodin. Fázově kontrastní mikroskopie. Zvětšení 600x. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



Obr. 38: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  na buněčnou smrt linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami ve stejném časovém intervalu



Obr. 39: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  na aktivitu kaspázy-8, -9 a -3 u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění



B

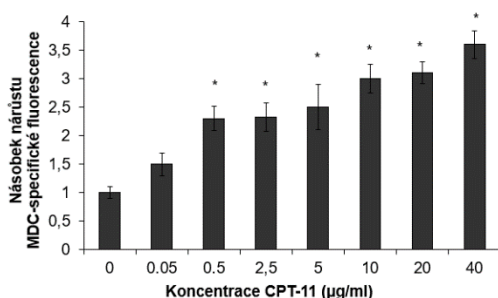
Obr. 40: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  na uvolňování cytochromu c z mitochondrií (A) do cytoplazmy (B) u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu



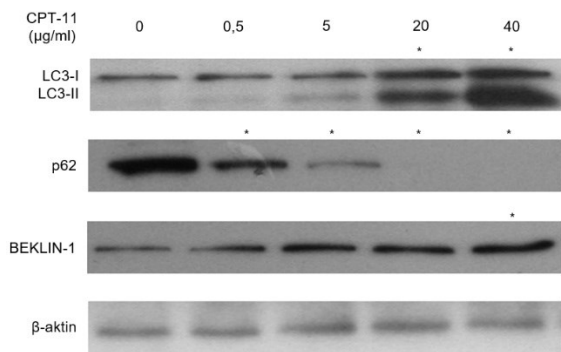
## 6.11 Úloha autofagie u nádorových střevních buněk s odstraněným *TP53* ovlivněných CPT-11

Morfologická analýza buněk, pozvolný nástup projevů apoptózy i její celková úroveň u ovlivněných buněk naznačovala možnou přítomnost a zapojení další buněčné odpovědi na tento druh stresu. Jedním z možných kandidátů mohla být zvýšená úroveň autofagie – coby obranný buněčný mechanismus. V dalším kroku jsme tedy zkoumali, zda u CPT-11 ovlivněných buněk dochází k současné stimulaci autofagie. K detekci autofagie jsme použili specifický marker monodansylkadaverin (MDC), což je fluorescenční sloučenina, která se vmezeřuje do autofagických vakuol a tím je specificky označuje. Jak je patrné na Obr. 41, významně zvýšená MDC fluorescence naznačující signifikantní přítomnost autofagie byla detekovatelná u HCT-116-TP53KO vystavených již velmi nízké CPT-11 koncentraci (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Se zvyšujícími se koncentracemi CPT-11 úroveň navozené autofagie stoupala, nicméně v rozmezí cytotoxických koncentrací se již dále významně neměnila. Přítomnost koncentračně závislé autofagické aktivity buněk byla dále ověřena i prostřednictvím analýz exprese příslušných proteinů, kdy byla pozorována zvýšená exprese proteinu BEKLINU-1, konverze proteinu LC3-I na LC-II či degradace proteinu p62 (Obr. 42). Pro mechanistické potvrzení aktivace tohoto procesu u CPT-11 vystavených buněk jsme dále použili specifické inhibitory autofagie, které ji ovlivňují různými mechanismy a v různých fázích (časná – 3-MA, pozdní – chlorochin). Jejich vliv na CPT-11 stimulovanou autofagii byl odlišný; zatímco inhibitor časně fáze autofagie významně tuto buněčnou odpověď inhiboval, inhibitor pozdní fáze autofagii spíše vyvolanou autofagii podněcoval (Obr. 43 a 44).

Celý proces autofagie je závislý na správné funkci lysosomů. CPT-11 v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  vyvolal během 48 hodin změny jejich distribuce v buňce a podněcoval permeabilizaci lysosomální membrány (Obr. 45 a 46). Jedním z možných činitelů odpovědných za tuto permeabilizaci je i protein BAX. Pro ověření jeho zapojení do stávajícího procesu, byla provedena u kontrolních i ovlivněných buněk gradientová centrifugace, kterou jsme připravili celkem 7 lysosomálních a mitochondriálních buněčných frakcí. Tyto byly následně testovány na přítomnost lysosomální fosfatázy, lysosomálního membránového proteinu LAMP-1, mitochondriálního proteinu COX-IV a proteinu BAX. V kontrolních vzorcích byl BAX lokalizován ve frakcích spolu s COX-IV, tyto frakce měly malou aktivitu kyselé fosfatázy a nízký obsah LAMP-1. Oproti tomu po ovlivnění CPT-11 byl BAX lokalizován ve všech připravených frakcích včetně lysosomálních s vysokou expresí LAMP-1, kyselé fosfatázy a nízkou expresí COX-IV (obr. 47 a 48).

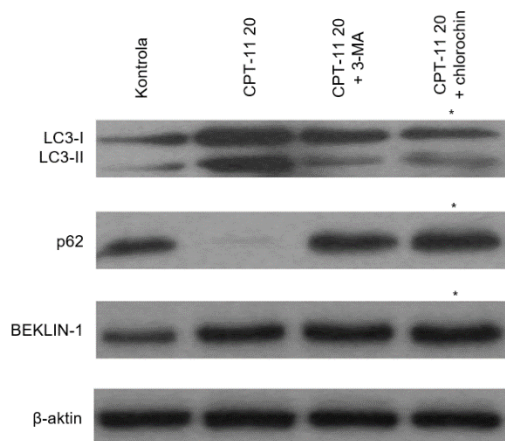
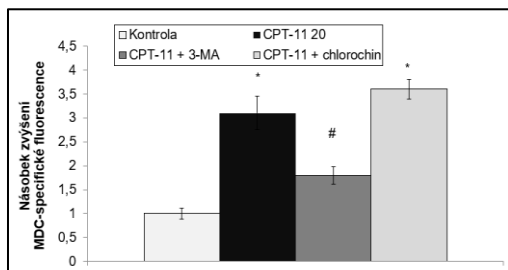


Obr. 41: MDC-specifická fluorescence buněk odpovídající autofagii u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-40  $\mu\text{g/ml}$  v časovém intervalu 36 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu

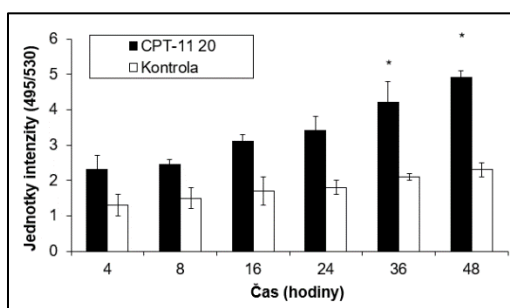


Obr. 42: Změny v expresi vybraných markerů autofagie buněk u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-40 µg/ml v časovém intervalu 36 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty byly denzitometricky analyzovány a \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu

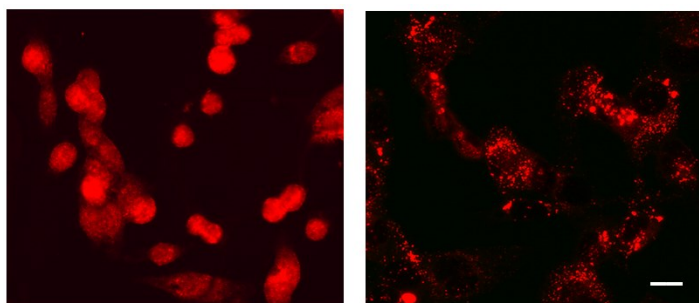
Obr. 43: MDC-specifická fluorescence buněk odpovídající autofagii u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml (samotný) nebo spolu se specifickými inhibitory autofagie (3-MA, chlorochin) v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu # $P < 0,05$  v porovnání s buňkami ovlivněnými pouze CPT-11 ve stejném časovém intervalu



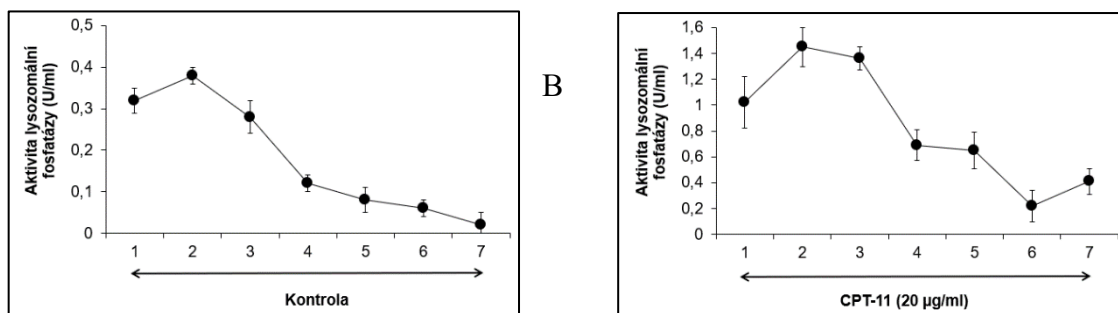
Obr. 44: Změny v expresi vybraných markerů autofagie buněk u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml (samotný) nebo spolu se specifickými inhibitory autofagie (3-MA, chlorochin) v časovém intervalu 36 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty byly denzitometricky analyzovány a \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu



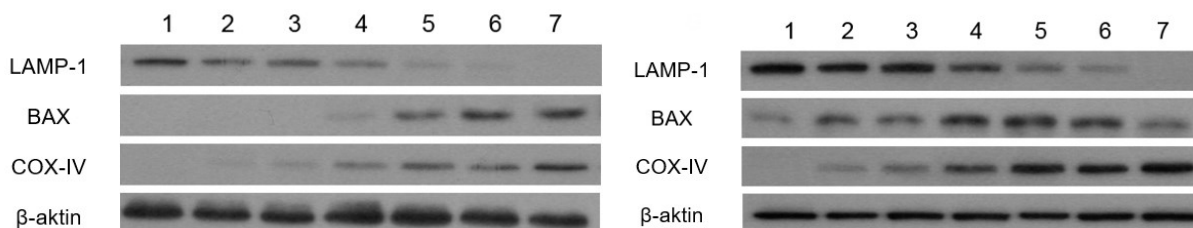
Obr. 45: Časový průběh permeabilizace lysosomální membrány u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml během 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu



Obr. 46: Permeabilizace lysosomální membrány u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  během 36 hodin. (A) Čas 0 (B) čas 36 hodin. Fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 200x, měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



Obr. 47: Aktivita lysosomální fosfatázy v lysosomálních a mitochondriálních frakcích buněk linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  během 36 hodin. (A) Kontrolní neovlivněné buňky (B) Buňky vystavené CPT-11

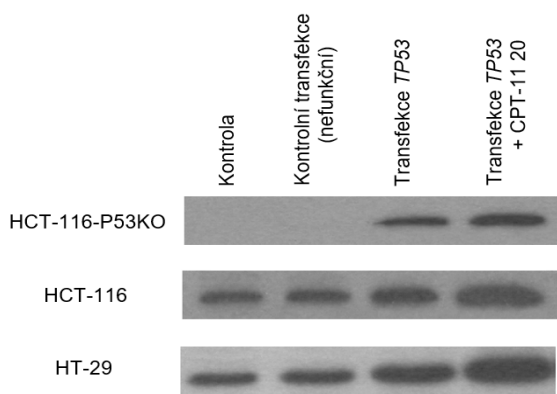


Obr. 48: Lokalizace proteinu BAX v lysosomálních a mitochondriálních frakcích buněk linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  během 36 hodin. (A) Kontrolní neovlivněné buňky (B) Buňky vystavené CPT-11. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty byly denzitometricky analyzovány

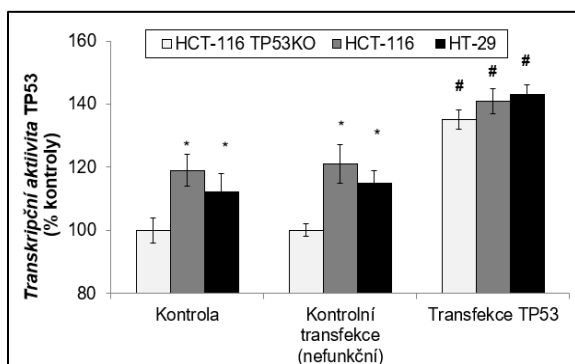
## 6.12 Vliv exprese proteinu *TP53* na CPT-11 stimulovanou buněčnou smrt u nádorových střevních buněk s odstraněným *TP53*

CPT-11 indukoval u stávající linie HCT-116-TP53KO apoptózu, nicméně v omezené míře a za současného zvýšení exprese autofagie a jejich markerů, což naznačovalo možný funkční vztah obou buněčných fenotypů k expresi *TP53*. Pro ověření této hypotézy jsme transfekovali HCT-116-TP53KO, ale i další CRC linie nesoucí divoké či mutované formy *TP53*, divokou dominantní formou genu *TP53* (Obr. 49 a 50). Takto ovlivněné buňky jsme následně vystavili CPT-11 po dobu 24 hodin. Buňky transfekované *TP53* byly k CPT-11 citlivější a úroveň navozené buněčné smrti se významně zvýšila, i když v nepřítomnosti podobně zvýšené aktivity kaspázy-3 a autofagie (Obr. 51, 52 a 53).

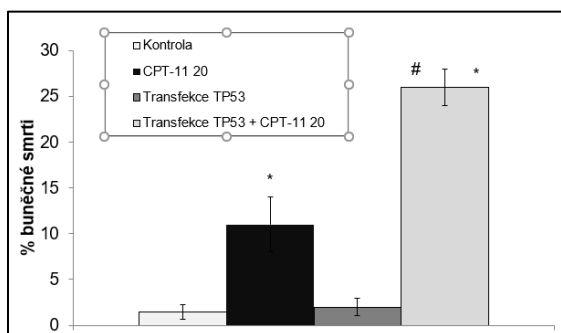




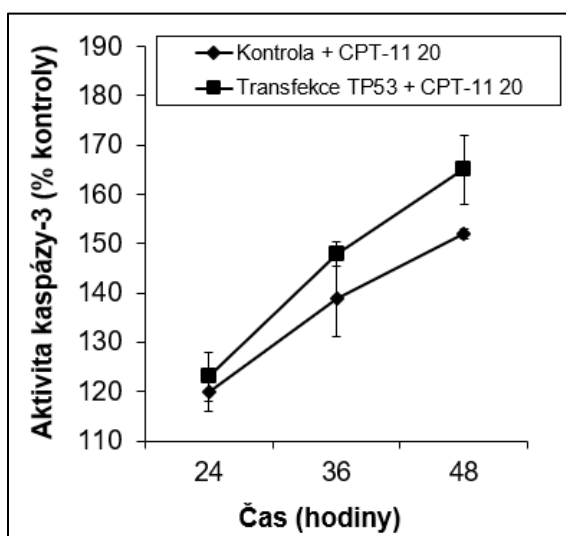
Obr. 49: Expres proteinu TP53 v transfekovaných buňkách linií kolorektálního karcinomu s divokou formou genu *TP53* (HCT-116), odstraněným genem *TP53* (HCT-116-P53KO) či mutovaným (HT-29) genem *TP53* a vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  na tuto expresi v časovém intervalu 24 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty byly denzitometricky analyzovány.



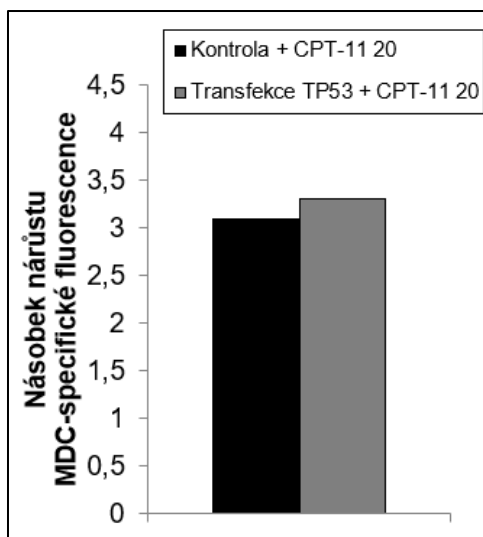
Obr. 50: Transkripční aktivita proteinu TP53 v netransfekovaných a transfekovaných buňkách linií kolorektálního karcinomu s divokou formou genu *TP53* (HCT-116), odstraněným genem *TP53* (HCT-116-P53KO) či mutovaným (HT-29) genem *TP53* ovlivněných irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  v časovém intervalu 24 hodin.. \* $P < 0,05$  v porovnání s linií HCT-116 TP53KO a # $P < 0,05$  v porovnání s netransfekovanými liniemi



Obr. 51: Vliv exprese proteinu TP53 na irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) indukovanou buněčnou smrt v časovém intervalu 48 hodin u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami a # $P < 0,05$  v porovnání s buňkami ovlivněnými CPT-11



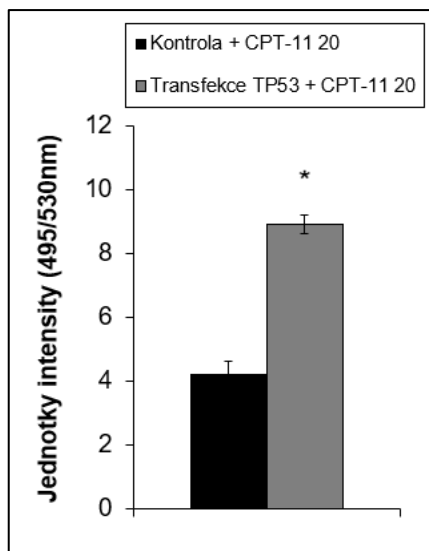
Obr. 52: Vliv exprese proteinu TP53 na irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) indukovanou aktivitu kaspázy-3 v časovém intervalu 48 hodin u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO.



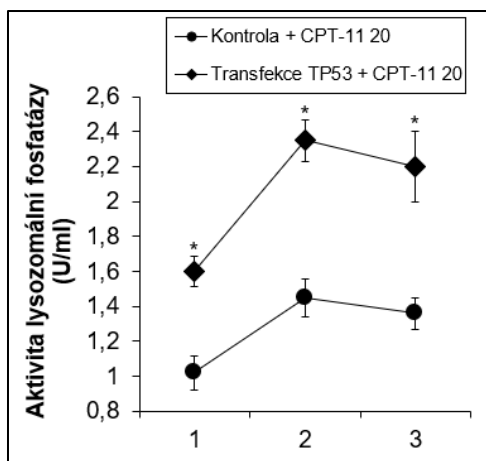
Obr. 53: Vliv exprese proteinu TP53 na irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) indukovaný nárůst specifické MDC fluorescence jako indikátoru autofagie v časovém intervalu 48 hodin u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO.

### 6.13 Význam proteinu BAX v buněčné smrti indukované CPT-11 u nádorových střevních buněk s odstraněným *TP53*

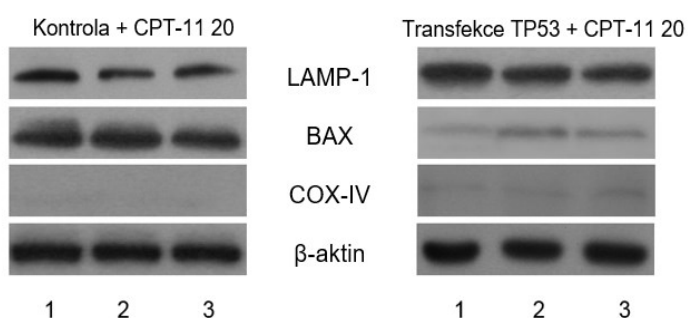
U buněk linie HCT-116-TP53KO vystavené CPT-11 jsme pozorovali zvýšení lysosomální permeability a aktivity lysosomální fosfatázy (Obr. 54 a 55). Tyto změny v lysosomech korelovaly s vyšší expresí proteinu BAX v tomto kompartmentu (Obr. 56). Abychom potvrdili význam proteinu BAX v těchto dějích, přistoupili jsme k selektivnímu potlačení jeho exprese pomocí metody siRNA. Úspěšné snížení exprese proteinu BAX (Obr. 57) vedlo při srovnání se stejně ovlivněnými buňkami těže linie s normální expresí BAX ke statisticky významnému potlačení buněčné smrti vyvolané CPT-11 spojeného se sníženou aktivitou kaspázy-3 (obr. 58 a 59). Dále jsme zaznamenali redukci permeability lysosomální membrány (obr. 60).



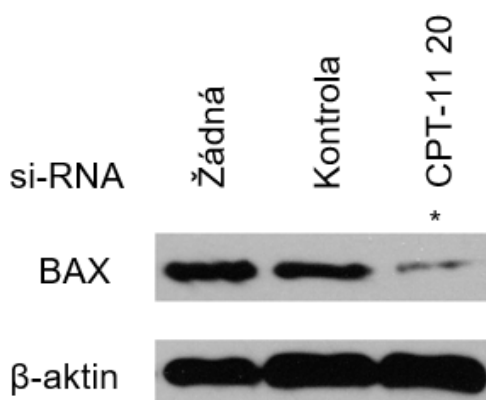
Obr. 54: Vliv exprese proteinu TP53 na lysosomální permeabilizaci u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) během 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními netransfekovanými buňkami



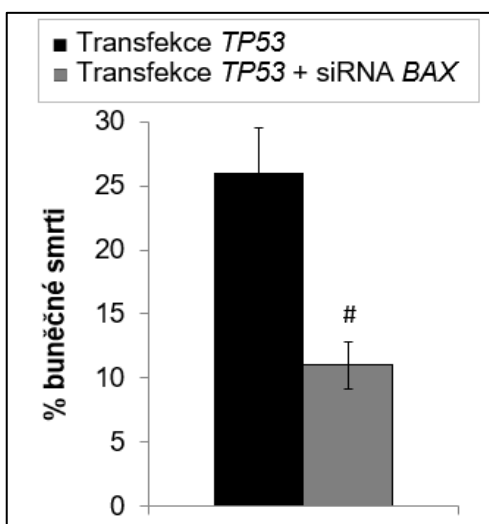
Obr. 55: Vliv exprese proteinu TP53 na aktivitu lysozomální fosfatázy v lysosomálních frakcích 1-3 buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11, 20 µg/ml) během 36 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními netransfekovanými buňkami



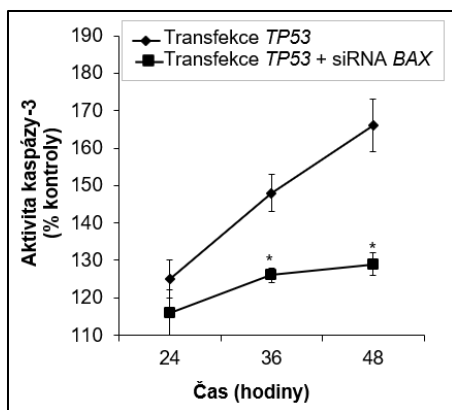
Obr. 56: Vliv exprese proteinu TP53 na lokalizaci proteinu BAX v lysosomálních frakcích 1-3 u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11, 20 µg/ml) během 36 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunobloty byly denzitometricky analyzovány



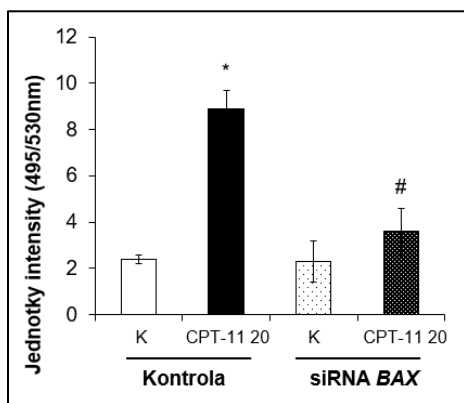
Obr. 57: Expresa proteinu BAX po specifickém umlčení jeho genu metodou siRNA u buněk linie kolorektálního karcinomu s transfekovaným genem *TP53* - HCT-116-P53TR. ovlivněných irinotekanem (CPT-11, 20 µg/ml) v časovém intervalu 48 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunobloty byly denzitometricky analyzovány a \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními buňkami



Obr. 58: Vliv snížené exprese proteinu BAX (metoda siRNA) na irinotekanem (CPT-11, 20 µg/ml) indukovanou buněčnou smrt v časovém intervalu 48 hodin u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO. #  $P < 0,05$  v porovnání s buňkami s normální expresí BAX



Obr. 59: Vliv snížené exprese proteinu BAX (metoda siRNA) na irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) indukovanou aktivitu kaspázy-3 v časovém intervalu 48 hodin u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO \*  $P < 0,05$  v porovnání s buňkami s normální expresí BAX



Obr. 60: Vliv snížené exprese proteinu BAX (metoda siRNA) na irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) indukovanou permeabilitu lyzozomální membrány v časovém intervalu 48 hodin u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO \*  $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami a #  $P < 0,05$  v porovnání s buňkami s normální expresí BAX

## 7. Diskuze

Od objevu irinotekanu (CPT-11) a počátků jeho praktického využití uplynulo již 20 let. Od té doby hraje nezastupitelnou roli v mnoha chemoterapeutických režimech u celé řady nádorových onemocnění. Jednou z mnoha podmínek správné účinnosti tohoto chemoterapeutika je i jeho distribuce do místa svého působení, tedy k nádorovým buňkám. Toto by měla zaručit dostatečná plazmatická koncentrace odvozovaná v praxi většinou od celkového tělesného povrchu pacienta. V léčebných schématech pokročilého kolorektálního karcinomu se CPT-11 uplatňuje v přibližném dávkovém rozmezí 150-350  $\text{mg/m}^2$  a plazmatické koncentrace takto dosahují 1-10  $\mu\text{g/ml}$  (Mathijssen *et al.* 2002; Vanhoefer *et al.* 2001). V rámci intraarteriálního podání můžou tyto koncentrace až několikanásobně vzrůst. (Hofmann *et al.* 2005) Z tohoto pohledu byly námi testované a použité koncentrace klinicky srovnatelné.

Při cytostatické léčbě nádorových onemocnění nedochází k ovlivnění pouze nádorových buněk samotných, ale též různých buněčných typů v celém těle, a to včetně buněk tlustého střeva. Toto souvisí s celkovým bezpečnostním profilem tohoto cytostatika a je příčinou nežádoucích účinků v běžné klinické praxi. (Di Paolo *et al.* 2011) Ovlivnění nenádorových buněčných linií vyplývá z možnosti přestupu CPT-11 do buněk střeva z krevního řečiště či přímo ze střevního lumen. Dávkově závislý efekt cytostatik včetně CPT-11 na buněčnou smrt, potažmo na apoptózu a senescenci byl podložen mnoha pozorováními laboratorními i klinickými. (Haug *et al.* 2008; Probin *et al.* 2006; Rothenberg 2001)

Naše úvodní práce se proto zabývala zejména detaily buněčné odpovědi nenádorových linií tlustého střeva NCM (epitelová) a NCF (fibroblastová) na ovlivnění CPT-11. Byla porovnána dávková účinnost s vybraným modelem buněk kolorektálního karcinomu linie HCT-116, který představuje poměrně dobře prozkoumaný model buněk kolorektálního karcinomu. Dosažený toxický účinek CPT-11 vykazoval v rámci našich experimentů dávkově a časově

závislý efekt. Morfologické změny z větší části odpovídaly buněčné smrti, zejména u nádorových buněk tak žádoucí. Poškození ve formě zlomů DNA aktivovalo mitochondrie, uvolnilo z nich cytochrom c a cestou kaspáz vedlo ke smrti apoptózou, což odpovídá jiným experimentálním pozorováním. (Haug *et al.* 2008)

Tyto změny ale byly více vyjádřeny u linií HCT-116 a epiteliální nenádorové NCM; po ovlivnění CPT-11 vstupovaly převážně do mitochondriální, na kaspázách závislé apoptózy. Oproti tomu fibroblastová linie NCF vykazovala spíše charakteristiky senescence, jak bylo prokázáno mikroskopicky a expresí  $\beta$ -galaktosidázy. U stejné linie došlo ke snížení metylace DNA a zvýšení buněčné adhesivity, což dále dokazuje vhodnost těchto markerů k detekci senescence. (Ben-Porath and Weinberg 2005). Ačkoliv tyto závěry korelují s dostupnými poznatky v literatuře, nemůžou plně vysvětlit pozorované rozdíly v obou nenádorových buněčných liniích.

Senescence je též regulována stresovými kinázami, těmi samými kinázami zapojenými do regulace apoptózy. (Lee *et al.* 2017) V kontextu dalších událostí a signalizačních cílů je pak určen jejich finální efekt. K zodpovězení této otázky byly tedy dále zkoumány dráhy buněčné odpovědi na poškození DNA.

U obou linií byla zaznamenána poměrně časná aktivace signálních kináz ATM-Chk1 spolu s pozdější a méně signifikantní účastí dráhy ATR-Chk2. Dále byl též zaznamenán rozdíl v aktivaci MAPK p38. U linie NCM vyvolalo poškození DNA irinotekanem masivní aktivaci kinázy p38, která by dále mohla sloužit jako mediátor p53 závislé cesty apoptózy. Na rozdíl od toho opožděná a pouze mírná aktivace p38 u linie NCF může směřovat k jinému zásadnímu cíli, a to senescenci. Specifický aktivátor kinázy p38 u tohoto modelu bohužel zatím není přesně znám, ačkoliv je možné napojení na proteiny rodiny RAS a BRAF, tedy další mimořádně důležité signální dráhy u CRC. (Xu *et al.* 2014)

Rozdíl mezi aktivací rozličných stresových signálních drah byl dále pozorován na úrovni exprese TP53 a konkrétně specifické fosforylaci Ser-46 transkripční aktivaci. Je známo, že kombinace různých posttranslačních úprav proteinu TP53 a další interakce s kofaktory ústí v různorodé odpovědi TP53 na stres dle typu buňky. (Muller and Vousden 2013) V tomto případě by to mohla být pravda, pokud by ovšem byla zapojena TP53 signalizace.

Předpokládá se, že buněčné cesty TP53 – p21<sup>WAF1</sup> a p16<sup>INK4</sup> – Rb vedoucí k senescenci jsou velmi konzervativní. Pokud nějaké buňky tomuto procesu uniknou, jedná se o velmi agresivní, často dediferencované buněčné klony, které dokázaly překonat vliv p21<sup>WAF1</sup>, a to nejspíše cestou aktivace Bcl-xL/MCL1, dále bránící buněčné smrti. (de Carne Trecesson *et al.* 2011)

Ve srovnání s těmito údaji jsme odhalili velké rozdíly v expresi p16, která v případě linie NCM pozvolna klesala a pozvolna ale signifikantně rostla u linie NCF v průběhu celého experimentu. Specifický význam těchto proteinů pro apoptózu a senescenci jsme se dále rozhodli ověřit jejich umlčením pomocí siRNA. Potlačení exprese genu *TP53* mělo zásadní vliv na snížení úrovně navozené apoptózy, vyřazení genu *p16* vedlo naopak u obou testovaných linií bez rozdílu k výraznému snížení úrovně senescentních projevů. Poškození DNA tedy může v našem experimentu aktivovat též dráhu p16 končící u buněčné senescence jako variantě k programované buněčné smrti, což je ve shodě s dostupnými poznatky. (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007)

Mimo to, aktivace p16 indukovaná poškozením DNA spolu s následnou senescencí může být dle literatury též spojena a regulována specifickými microRNA. (Chang *et al.* 2007)

Porovnali jsme proto expresní profily miR-34a, miR-128a a miR-449a u obou ovlivněných linií. U buněk NCM zvýšil CPT-11 pouze expresi miR-34, což může mít za následek snížení exprese SIRT1 a p53 acetylaci, která u těchto buněk dále zprostředkuje senescenci. (Langley *et al.* 2002) Je zajímavé, že ta samá miR-34a může způsobit senescenci cestou downregulace E2F u buněk kolorektálního karcinomu (Tazawa *et al.* 2007), nebo alternativními TP53

nezávislým mechanismem. (Feliciano *et al.* 2011) Zvýšené hladiny miR-34a nebyly samy o sobě schopné překonat mohutný efekt TP53, což dokazuje nedostatek specifické acetylace u buněk linie NCM. Na druhou stranu nemůžeme úplně vyloučit, že miR-34a může působit i jinými mechanismy, protože senescence byla více méně přítomná ve všech ovlivněných vzorcích.

Naproti tomu exprese všech tří zkoumaných microRNA byla u nenádorové linie NCF po ovlivnění CPT-11 zvýšena, což může být příčinou preference senescentního fenotypu těchto buněk. Tento efekt by mohl být TP53 závislý (kvůli prokázané specifické acetylaci) i nezávislý. (Chen *et al.* 2017)

V dalších fázích našich experimentů jsme se vrátili ke zkoumání mechanismům účinku CPT-11 na buňky kolorektálního karcinomu. S ohledem na předchozí výsledky jsme z modelových linií vybrali buňky SW-620, které představují model již pokročilého kolorektálního karcinomu, protože byly původně odebrány z metastázy v lymfatické uzlině. Větší agresivitu této linie podporuje i námi zkoumaný mutovaný gen *TP53*.

V úvodu jsme opět ověřili vliv CPT-11 na inhibici proliferace a snížení viability buněk, která vykazovala časovou i dávkovou závislost. Buněčná smrt vykazovala známky na kaspázách závislé apoptózy. Dále jsme ověřili i účast jiných mechanismů buněčné smrti, zejména autofagie. Působení tohoto mechanismu se nám však nepodařilo prokázat ani na úrovni proteinu či mRNA.

Z toho důvodu jsme se zaměřili na nitrobuněčnou signalizaci vedoucí k buněčné smrti, která byla dle našich výsledů vedena cestou aktivace checkpoint-kináz, konkrétně Chk1 i Chk2, a tedy alterací s dynamikou buněčného cyklu. (Petitprez *et al.* 2013) Dráha ATR/Chk1 je specifická pro jeho S-fázi a následnou zástavu mitózy (Bartek *et al.* 2004), zatímco dráha ATM/Chk2 ovlivňuje protein TP53 a vede k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi.

Vliv CPT-11 se projevil i nárůstem aktivity kinázy p38. Její aktivace po ovlivnění nádorových buněk různými cytostatiky se v minulosti již prokázala. (Chiu *et al.* 2008; Roux and Blenis 2004) V důsledku jejího napojení skrze antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 na regulaci buněčného cyklu, opravu poškozené DNA či autofagii, (De Chiara *et al.* 2006; Roux and Blenis 2004) má aktivace této kinázy za následek stimulaci mechanismů přežití buňky a tím zvýšenou rezistenci k cytostatické léčbě. (Guo *et al.* 2008) Tato rezistence však může být překonána specifickými inhibitory p38 (Paillas *et al.* 2011), což se zdá opět slibné k léčbě nejen nádorových onemocnění. (Li *et al.* 2013; Yong *et al.* 2009)

Na druhou stranu kromě stimulace přežití může tato kináza stimulovat apoptózu přímým ovlivněním p53 (Taylor *et al.* 2013) nebo cestou koaktivace transkripce. (Cuadrado *et al.* 2007)

Dále může zvýšená signalizace p38 pomáhat zachovat kontaktní inhibici (Faust *et al.* 2005), remodelovat cytoskelet (Woll *et al.* 2007) nebo podporovat senescenci buněk. (Xu *et al.* 2014) Význam p38 pro zachování životaschopnosti nádorových buněk a stejně tak jejich smrti se zdá být komplexní a závislý na mnoha faktorech. Jedním takovým kandidátem by mohlo být ovlivnění této kinázy ve správný čas. Dle našich experimentů se zdá, že prvních 12 hodin nedochází k dramatickým změnám aktivity. Po 12 hodinách však její aktivita pozvolna narůstá, což koreluje s velmi omezenými projevy apoptózy v tom samém období. Toto pozorování je potvrzeno i experimentem s inhibicí p38 u buněk ovlivněných irinotekanem, kdy po 12 hodinách signifikantně narostlo procento výskytu apoptózy a zůstalo zvýšené po celou dobu experimentu. Toto korelovalo též se sníženým buněčným přežíváním ve stejných časových intervalech. Kromě časné odpovědi na stres umožňující buňce podstoupit reparační procesy (Phong *et al.* 2010) představuje zřejmě p38 též důležitý regulátor autofagie. (Qiang *et al.* 2013)

Bohužel, žádný z předkládaných modelů se v našem experimentu nepotvrdil, což může být zapříčiněno různými mechanismy působení použitých cytostatik a stejně tak různorodostí

modelových nádorových buněk. Dle našich experimentů věříme, že aktivace p38 vedla k potlačení klíčových proapoptotických signálů a podpoře mechanismů přežití. Tato situace by mohla být dle literatury navozena např. aktivací HSP proteinů. (Murphy 2013) Toto zjištění je podloženo supresivním efektem inhibice p38 na celkovou smrt buněk a zvýšené buněčné přežívání v průběhu 48 hodin od ovlivnění.

P38 též může stimulovat apoptózu například ovlivněním exprese proapoptotických proteinů jako FasR a FasL, či BAX, BIM a NOXA rodiny Bcl-2. (Cai *et al.* 2006; Hsu *et al.* 1999) Výrazný cytotoxický efekt pozorovaný u buněk ovlivněných vyššími dávkami CPT-11 by kromě apoptózy mohl souviset i s jinými mechanismy buněčného zániku. Avšak pozorováním morfologických, biochemických i molekulárních charakteristik v průběhu buněčné smrti jsme neprokázali signifikantní přítomnost například autofagií-vyvolané buněčné smrti či nekrózy. Vzhledem k přirozené buněčné rozmanitosti našeho experimentálního systému a detekčním limitům nemůžeme přesto vyloučit, že se tyto způsoby buněčné smrti mohly na celkovém výsledku podílet.

Klíčový význam v regulaci pochodů vedoucích k buněčné smrti představuje protein TP53. Mutace v jeho genu je spojována s vyšší agresivitou a zvýšeným přežíváním nádoru při cytostatické léčbě. (Matt and Hofmann 2016; Morgan and Kastan 1997)

V poslední části naší práce jsme se snažili ověřit právě vliv tohoto proteinu na mechanismy buněčné smrti vlivem CPT-11. K experimentům jsme vybrali nádorovou buněčnou linii HCT-116-P53KO, která vykazuje nefunkční gen *TP53* (mutace v exonu 2). (Boyer *et al.* 2004; Bunz *et al.* 1999) Po ovlivnění CPT-11 jsme prokázali dávkově závislou cytotoxicitu s poškozením DNA, která dále vedla k apoptóze závislé na aktivaci mitochondrií a kaspáz. Přestože byla tato reakce očekávána, snažili jsme se prokázat i možné zapojení jiných popsaných mechanismů, zejména autofagie jako způsobu přežití. (Paillas *et al.* 2011; Sui *et al.* 2013) K tomuto jsme vybrali několik běžně používaných markerů též ve spojitosti s inhibitory časných i pozdních fází autofagie, avšak žádné změny (zvýšení) apoptózy nebylo zaznamenáno. Autofagie v tomto případě tedy představovala spíše způsob smrti buněk než mechanismus pro přežití, na čemž se pravděpodobně podílel i nefunkční protein TP53. (Hale *et al.* 2013) K lepšímu porozumění vztahu mezi autofagií a apoptózou jsme zaměřili na lysozomy, které by mohli představovat pojítko mezi těmito ději. (Maiuri *et al.* 2007) Ovlivnění CPT-11 vedlo ke zvýšené permeabilitě lysozomálních membrán v souvislosti s možnou účastí proteinu BAX, jehož zvýšený výskyt jsme zjistili v lysozomální i mitochondriální buněčné frakci. Translokace BAX z cytoplazmy do mitochondrií by dle literatury měla zvyšovat propustnost jejich membrán; stejně tak může obdobným mechanismem dojít k permeabilitě lysozomů. (Karch *et al.* 2017) Snížení exprese BAX pomocí siRNA vedlo v našem experimentu po ovlivnění CPT-11 též ke snížení známek buněčné smrti ve smyslu nižší kaspázové aktivity a stejně tak menší permeability lysozomů. V našem modelu s nefunkčním TP53 tedy BAX přispíval k buněčné smrti apoptózou i autofagií. K určení možného vlivu TP53 v našich podmínkách jsme provedli transfekci divokého genu *TP53* do buněk HCT-116-P53KO a následně ověřili jeho expresi. Po této transfekci a ovlivnění CPT-11 došlo k signifikantnímu zvýšení známek buněčné smrti, ačkoliv úroveň autofagie se nezměnila. Přímá účast TP53 v procesu autofagie je komplikovaná. Dle dostupných dat se zdá, že přítomnost TP53 v jádře působí spíše proautofagicky, zatímco cytoplazmatická autofagii potlačuje. (Morselli *et al.* 2008) Z tohoto pohledu vedlo obnovení funkce TP53 k většímu výskytu buněčné smrti po ovlivnění CPT-11, ačkoliv neovlivnilo autofagii.

Naše výsledky potvrzují, že nádorové a nenádorové linie mohou na ovlivnění CPT-11 reagovat odlišným mechanismem. Zásadní význam v tomto hraje protein TP53 a zachovalá signalizace při poškození DNA s účastí p38 či dokonce některých microRNA. U nádorových modelů je hlavním mechanismem buněčné smrti apoptóza, avšak aktivace autofagie

pravděpodobně za přispění BAX, mitochondrií a lysozomů je též možná a není při apoptóze vyloučena. Oproti tomu nenádorové modely mohou na CPT-11 reagovat kromě apoptózy i odlišně, například indukcí senescence.

Z uvedeného vyplývá, že všechny tyto souvislosti by nám do budoucna mohly pomoci lépe a efektivněji nasměrovat protinádorovou léčbu či snížit její toxicitu. Přestože nám v současnosti věda a často i klinická praxe dovoluje vyřadit z funkce mnoho různých genů či proteinů, a tak významně ovlivnit průběh onemocnění, námi označené terapeutické cíle medicínskému ovlivnění stále unikají. V případě proteinu TP53 je možným vysvětlením právě komplexnost jeho regulace a i jeho široká funkčnost, kterou budeme muset pochopit mnohem hlouběji.

### **Závěry**

A. Irinotekan (CPT-11) prokázal svoji toxicitu inhibicí proliferace a snížením viability u námi vybraných buněčných modelů kolorektálního karcinomu i nenádorových buněčných linií. Jeho efekt byl dávkově závislý a již od 20 µg/ml způsoboval detekovatelné změny buněčného chování a signalizace. Ovlivnění nenádorových buněčných linií CPT-11 mělo za následek dle konkrétního buněčného typu indukcí apoptózy a/nebo senescence. Epiteliální linie NCM odpovídala TP53-závislou mitochondriální cestou apoptózy s účastí kinázy p38. Fibroblastová linie NCF prokazovala preferenčně znaky senescence cestou aktivace proteinů TP53 a p16 s možnou účastí některých microRNA. Apoptóza indukovaná CPT-11 byla TP53-závislá, zatímco senescence byla ovlivněna TP53 i p16.

B. U modelu pokročilého kolorektálního karcinomu způsoboval CPT-11 v nižších dávkách pomalý nárůst aktivity kinázy p38, což mělo za následek aktivaci intracelulárních mechanismů přežití a inhibici apoptózy. Vyšší dávky způsobily rychlou aktivaci kinázy p38 a následně spuštění mitochondriální cesty apoptózy vedoucí k buněčné smrti.

C. Buňky linie kolorektálního karcinomu s inaktivovaným TP53 reagovali na ovlivnění CPT-11 buněčnou smrtí v podobě apoptózy pouze v omezené míře. Naproti tomu vzrostl význam alternativních procesů, například autofagie. Potvrdila se tím klíčová, avšak komplikovaná úloha TP53 v signalizaci nádorových buněk na stresové podněty.

D. Ovlivnění nitrobuněčné signalizace (kinázy Chk1, Chk2, p38) odkrylo zajímavé terapeutické možnosti, avšak přesné mechanismy regulace a jejich složité zapojení do mnoha intracelulárních okruhů je činí v léčbě kolorektálního karcinomu často pouze cílem experimentálním. Potvrdili jsme též nesporný význam proteinu TP53 v ovlivnění buněčné smrti i přežívání, avšak i tento protein je zatím testován jako možný terapeutický cíl spíše pouze v preklinických studiích.

BARTEK, J., C. LUKAS AND J. LUKAS Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Oct 2004, 5(10), 792-804.

BEN-PORATH, I. AND R. A. WEINBERG The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, May 2005, 37(5), 961-976.

BOYER, J., E. G. MCLEAN, S. AROORI, P. WILSON, et al. Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin Cancer Res*, Mar 15 2004, 10(6), 2158-2167.

BUNZ, F., P. M. HWANG, C. TORRANCE, T. WALDMAN, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*, Aug 1999, 104(3), 263-269.

CAI, B., S. H. CHANG, E. B. BECKER, A. BONNI, et al. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem*, Sep 01 2006, 281(35), 25215-25222.

CAMPISI, J. AND F. D'ADDA DI FAGAGNA Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Sep 2007, 8(9), 729-740.



CUADRADO, A., V. LAFARGA, P. C. CHEUNG, I. DOLADO, et al. A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *EMBO J*, Apr 18 2007, 26(8), 2115-2126.

DE CARNE TRECESSON, S., Y. GUILLEMIN, A. BELANGER, A. C. BERNARD, et al. Escape from p21-mediated oncogene-induced senescence leads to cell dedifferentiation and dependence on anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 proteins. *J Biol Chem*, Apr 15 2011, 286(15), 12825-12838.

DE CHIARA, G., M. E. MARCOCCI, M. TORCIA, M. LUCIBELLO, et al. Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. *J Biol Chem*, Jul 28 2006, 281(30), 21353-21361.

DI PAOLO, A., G. BOCCI, M. POLILLO, M. DEL RE, et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic predictive markers of irinotecan activity and toxicity. *Curr Drug Metab*, Dec 2011, 12(10), 932-943.

DUŠEK, L., J. MUŽÍK, M. KUBÁSEK, J. KOPTÍKOVÁ, et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online] Masarykova univerzita, 2005.

FAUST, D., I. DOLADO, A. CUADRADO, F. OESCH, et al. p38alpha MAPK is required for contact inhibition. *Oncogene*, Nov 24 2005, 24(53), 7941-7945.

FELICIANO, A., B. SANCHEZ-SENDRA, H. KONDOH AND M. E. LLEONART MicroRNAs Regulate Key Effector Pathways of Senescence. *J Aging Res*, 2011, 2011, 205378.

FERLAY, J. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. GLOBOCAN 2012 v 1.0 2013 2012.

GALLUZZI, L., I. VITALE, S. A. AARONSON, J. M. ABRAMS, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, Mar 2018, 25(3), 486-541.

GUO, X., N. MA, J. WANG, J. SONG, et al. Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapy resistance in human gastric cancer cells. *BMC Cancer*, Dec 18 2008, 8, 375.

HALE, A. N., D. J. LEDBETTER, T. R. GAWRILUK AND E. B. RUCKER, 3RD Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy*, Jul 2013, 9(7), 951-972.

HAUG, K., K. L. KRAVIK AND P. M. DE ANGELIS Cellular response to irinotecan in colon cancer cell lines showing differential response to 5-fluorouracil. *Anticancer Res*, Mar-Apr 2008, 28(2A), 583-592.

HOFMANN, C., K. BUTTENSCHOEN, J. STRAETER, D. HENNE-BRUNS, et al. Pre-clinical evaluation of the activity of irinotecan as a basis for regional chemotherapy. *Anticancer Res*, Mar-Apr 2005, 25(2A), 795-804.

HSU, S. C., M. A. GAVRILIN, M. H. TSAI, J. HAN, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is involved in Fas ligand expression. *J Biol Chem*, Sep 03 1999, 274(36), 25769-25776.

HUANG, C. Y. AND L. C. YU Pathophysiological mechanisms of death resistance in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*, Nov 7 2015, 21(41), 11777-11792.

HUANG, L. C. AND A. MERCHEA Dysplasia and Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am*, Jun 2017, 97(3), 627-639.

CHANG, Y. F., J. S. IMAM AND M. F. WILKINSON The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76, 51-74.

CHEN, J., A. WANG AND Q. CHEN SirT3 and p53 Deacetylation in Aging and Cancer. *J Cell Physiol*, Sep 2017, 232(9), 2308-2311.

CHIU, S. J., J. I. CHAO, Y. J. LEE AND T. S. HSU Regulation of gamma-H2AX and securin contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells. *Toxicol Lett*, Jun 30 2008, 179(2), 63-70.

KARCH, J., T. G. SCHIPS, B. D. MALIKEN, M. J. BRODY, et al. Autophagic cell death is dependent on lysosomal membrane permeability through Bax and Bak. *Elife*, Nov 17 2017, 6.

KERR, J. F., A. H. WYLLIE AND A. R. CURRIE Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, Aug 1972, 26(4), 239-257.

LANGDON, S. P. Basic principles of cancer cell culture. *Methods Mol Med*, 2004, 88, 3-15.

LANGLEY, E., M. PEARSON, M. FARETTA, U. M. BAUER, et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J*, May 15 2002, 21(10), 2383-2396.

LEE, C. S., J. BAEK AND S. Y. HAN The Role of Kinase Modulators in Cellular Senescence for Use in Cancer Treatment. *Molecules*, Aug 25 2017, 22(9).

LI, L., G. LI, C. YU AND Y. LI A meta-analysis of the role of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors in patients with active rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, Dec 2013, 32(12), 1697-1702.

LIVAK, K. J. AND T. D. SCHMITTGEN Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, Dec 2001, 25(4), 402-408.

MAIURI, M. C., E. ZALCKVAR, A. KIMCHI AND G. KROEMER Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Sep 2007, 8(9), 741-752.

MATHIJSEN, R. H., J. VERWEIJ, W. J. LOOS, P. DE BRUIJN, et al. Irinotecan pharmacokinetics-pharmacodynamics: the clinical relevance of prolonged exposure to SN-38. *Br J Cancer*, Jul 15 2002, 87(2), 144-150.

MATT, S. AND T. G. HOFMANN The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cell Mol Life Sci*, Aug 2016, 73(15), 2829-2850.

MENDIS, S. E. A. Global status report on noncommunicable diseases 2014. In.: WHO, 2014.

MORGAN, S. E. AND M. B. KASTAN p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv Cancer Res*, 1997, 71, 1-25.

MORSELLI, E., E. TASDEMIR, M. C. MAIURI, L. GALLUZZI, et al. Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle*, Oct 2008, 7(19), 3056-3061.

MULLER, P. A. AND K. H. VOUSDEN p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*, Jan 2013, 15(1), 2-8.

MUNOZ-ESPIN, D. AND M. SERRANO Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Jul 2014, 15(7), 482-496.

MURPHY, M. E. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, Jun 2013, 34(6), 1181-1188.

NISHIHARA, H., S. KIZAKA-KONDOH, P. A. INSEL AND L. ECKMANN Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jul 22 2003, 100(15), 8921-8926.

PAILLAS, S., F. BOISSIERE, F. BIBEAU, A. DENOUEL, et al. Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res*, Feb 01 2011, 71(3), 1041-1049.

PARSONS, M. T., D. D. BUCHANAN, B. THOMPSON, J. P. YOUNG, et al. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*, Mar 2012, 49(3), 151-157.

PETITPREZ, A., V. POINDESSOUS, D. OUARET, M. REGAIRAZ, et al. Acquired irinotecan resistance is accompanied by stable modifications of cell cycle dynamics independent of MSI status. *Int J Oncol*, May 2013, 42(5), 1644-1653.

PHONG, M. S., R. D. VAN HORN, S. LI, G. TUCKER-KELLOGG, et al. p38 mitogen-activated protein kinase promotes cell survival in response to DNA damage but is not required for the G(2) DNA damage checkpoint in human cancer cells. *Mol Cell Biol*, Aug 2010, 30(15), 3816-3826.

PROBIN, V., Y. WANG, A. BAI AND D. ZHOU Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*, Nov 2006, 319(2), 551-560.

QIANG, L., C. WU, M. MING, B. VIOLLET, et al. Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem*, Jan 18 2013, 288(3), 1603-1611.

ROTHENBERG, M. L. Irinotecan (CPT-11): recent developments and future directions--colorectal cancer and beyond. *Oncologist*, 2001, 6(1), 66-80.

ROUX, P. P. AND J. BLENIS ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, Jun 2004, 68(2), 320-344.

RYAN, E., K. SHEAHAN, B. CREAVIN, H. M. MOHAN, et al. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing. *Crit Rev Oncol Hematol*, Aug 2017, 116, 38-57.

SOBIN, L. H., M. K. GOSPODAROWICZ AND C. WITTEKIND *TNM Classification of Malignant Tumours, Seventh Edition*. Edition ed.: Wiley-Blackwell, 2009. Translation of: TNM Klasifikace zhoubných nádorů, česká verze 2011. ISBN 978-1-4443-5896-4.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, Dec 01 2009, 1(2), 1-4.

SUI, X., R. CHEN, Z. WANG, Z. HUANG, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis*, Oct 10 2013, 4, e838.

TASDEMIR, E., M. C. MAIURI, L. GALLUZZI, I. VITALE, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*, Jun 2008, 10(6), 676-687.

TAYLOR, C. A., Q. ZHENG, Z. LIU AND J. E. THOMPSON Role of p38 and JNK MAPK signaling pathways and tumor suppressor p53 on induction of apoptosis in response to Ad-eIF5A1 in A549 lung cancer cells. *Mol Cancer*, May 02 2013, 12, 35.

TAZAWA, H., N. TSUCHIYA, M. IZUMIYA AND H. NAKAGAMA Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Sep 25 2007, 104(39), 15472-15477.

THORNBERRY, N. A. AND Y. LAZEBNIK Caspases: enemies within. *Science*, Aug 28 1998, 281(5381), 1312-1316.

VANHOEFER, U., A. HARSTRICK, W. ACHTERRATH, S. CAO, et al. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. *J Clin Oncol*, Mar 01 2001, 19(5), 1501-1518.

VOGELSTEIN, B., E. R. FEARON, S. R. HAMILTON, S. E. KERN, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, Sep 01 1988, 319(9), 525-532.

WOLL, S., R. WINDOFFER AND R. E. LEUBE p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J Cell Biol*, Jun 4 2007, 177(5), 795-807.

XU, Y., N. LI, R. XIANG AND P. SUN Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends Biochem Sci*, Jun 2014, 39(6), 268-276.

YONG, H. Y., M. S. KOH AND A. MOON The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, Dec 2009, 18(12), 1893-1905.

## Přehled publikační činnosti

Původní vědecké práce v impaktovaném časopise:

- KRBAL L., SOUKUP J., **JOHN S.**, HANUŠOVÁ V. Derivation and basic characterization of colorectal carcinoma primary cell lines. *Biomedical Papers*, 2017, vol. 161, s. 360-368. ISSN 1213-8118. (IF 1,087)
- KRBAL L., HANUŠOVÁ V., SOUKUP J., **JOHN S.**, MATOUŠKOVÁ P., RYŠKA A. Contribution of in vitro comparison of colorectal carcinoma cells from primary and metastatic lesions to elucidation of mechanisms of tumor progression and response to anticancer therapy. *Tumor Biology*, 2016, vol. 37, s. 9565-9578. ISSN 1010-4283. (IF 3,6)
- MŽIK M., CHMELAŘOVÁ M., **JOHN S.**, LACO J., SLABÝ O., KISS I., BOHOVICOVÁ L., PALIČKA V., NEKVINDOVÁ J. Aberrant methylation of tumour suppressor genes WT1, GATA5 and PAX5 in hepatocellular carcinoma. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2016, vol. 54, s. 1971-1980. ISSN 1434-6621 (IF 1,71)
- MLČOCHOVÁ J., FALTEJSKOVA-VYCHYTILOVA P., FERRACIN M., ZAGATTI B., RADOVÁ L., SVOBODA M., NĚMEČEK R., **JOHN S.**, KISS I., VYZULA R., NEGRINI M., SLABÝ O. MicroRNA expression profiling identifies miR-31-5p/3p as associated with time to progression in wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Oncotarget*, 2015, vol. 6, s. 38695-38704. ISSN 1949-2553. (IF 3,45)
- RUDOLF E., KRÁLOVÁ V., RUDOLF K., **JOHN S.** The role of p38 in irinotecan-induced DNA damage and apoptosis of colon cancer cells. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2013, vol. 741-742, s. 27-34. ISSN 0027-5107 (IF 4,4)
- **JOHN S.**, MLS J., ČERVINKA M., RUDOLF E. The Role of Autophagic Cell Death and Apoptosis in Irinotecan-treated p53 Null Colon Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2013, vol. 13, s. 811-820. ISSN 1871-5206 (IF 2,939)
- RUDOLF E, **JOHN S.**, CERVINKA M.: Irinotecan induces senescence and apoptosis in colonic cells in vitro. 2012, *Toxicol Lett.* 2;214(1):1-8
- **JOHN S.**, BRIATKA T, RUDOLF E. Diverse sensitivity of cells representing various stages of colon carcinogenesis to increased extracellular zinc: implications for zinc chemoprevention. *Oncology Reports.*, 2011, vol. 25(3)s 769-80. (1,835)

Jiné:

- GRELL P, DVOŘÁK J, VOČKA M, JOHN S, TUŠKOVÁ H, BÜCHLER T, SELINGEROVÁ R, BOŘILOVÁ S, VYZULA R, KISS I, OBERMANNOVÁ R. Prediction of trifluridine/tipiracil (TAS-102) effectiveness in patients with refractory metastatic colorectal cancer (mCRC): Real-life data from the Czech Republic, *Journal of Clinical Oncology*, 2019 May, 37(15\_suppl):e15102-e15102 – plakátové sdělení
- GRELL P, DVOŘÁK J, VOČKA M, JOHN S, TUŠKOVÁ H, BÜCHLER T, SELINGEROVÁ R, BOŘILOVÁ S, VYZULA R, KISS I, OBERMANNOVÁ R.: TAS-102 in metastatic colorectal cancer (mCRC) - predictive and prognostic factors in a European patient population, 2018 Oct *Annals of Oncology* 29 (Suppl\_7) Abstract Book of the 43rd ESMO Congress (ESMO 2018)
- SIRÁK I., ŠINKOROVÁ Z., ŠENKERÍKOVÁ M., ŠPAČEK J., LACO J., VOŠMIKOVÁ H., **JOHN S.**, PETERA J. Hypersensitivity to chemoradiation in FANCA carrier with cervical carcinoma - A case report and review of the literature.

