

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

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Doktorský studijní program

**Lékařská biologie**

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

**Biological Characteristics of Colon Cancer Cells in *in vitro*  
Models and its Use For Individualization of Therapy**

**MUDr. Stanislav John**

Školitel: prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat. Souhlasím rovněž se zpřístupněním této práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

V Hradci Králové, 25. 04. 2019

Stanislav John

## **Poděkování**

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli a současnému vedoucímu Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové prof. PharmDr. Emilu Rudolfovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a mnohdy velkou trpělivost v průběhu celého mého postgraduálního studia a sestavování této disertační práce.

Neméně děkuji i bývalému vedoucímu Ústavu lékařské biologie a genetiky a emeritnímu děkanovi Lékařské fakulty v Hradci Králové prof. MUDr. RNDr. Miroslavu Červinkovi, CSc. za neocenitelné rady a velmi vstřícný přístup.

Také bych rád poděkoval všem milým spolupracovnicím a kolegyním z našeho ústavu za přátelské prostředí a pomoc nejen během tvorby této práce.

*„Rak slove otok neb nežit tvrdý, a počínát' se podobně s tvrdostí a horkostí a jeho kořenové suť žily okolo něho plny krve černé, a zarozující se obecně na ceckách neb na místech žlázovitých pod paží v tříselech.“*

Ranná lékařství arabského učence Rhazese a bolognského chirurga Salicettiho, překlad z 1. poloviny 15. století (autor neznámý)

*„Bud' vždy veselý – to je nejlepší medicína. Veselost je filozofie příliš málo pěstovaná. Je sluneční stranou života.“*

George Gordon Byron

*„Počátek zdraví spočívá ve znalosti vlastní nemoci.“*

Miguel de Cervantes

Stále málo poznané příčiny vzniku, obtížná a náročná léčba a často komplikovaný průběh s mnohdy fatálním koncem – to činí z rakoviny nemoc obestřenou tajemstvím a v neposlední řadě též strachem.

Od poloviny 20. století se s rozvojem molekulárně biologických přístupů v rámci nádorového výzkumu a protinádorové léčby vynakládá obrovské množství úsilí a prostředků. I přes výrazné pokroky na tomto poli je často diagnóza rakoviny pro moderní medicínu neřešitelná. Touto prací bych tedy rád přispěl svým „střípkem“ do oné skládačky poznání a tím snad částečně ulevil od přirozeného strachu z neznámého.

MUDr. Stanislav John, 25. 04. 2019

<b>Obsah</b>	<b>Strana</b>
<b>Prohlášení</b>	3
<b>Poděkování</b>	4
<b>Obsah</b>	6
<b>Seznam zkratk</b>	9
<b>Část 1.</b>	13
<b>1.1 Souhrn</b>	14
<b>1.2 Úvod</b>	16
<b>1.2.1 Kolorektální karcinom</b>	16
1.2.1.1 Epidemiologie	16
1.2.1.2 Rizikové faktory	19
1.2.1.3 Patogeneze	19
1.2.1.4 Léčba	23
<b>1.3 Molekulární mechanismy vzniku kolorektálního karcinomu</b>	24
1.3.1 Rozdělení	24
1.3.2 Klíčové geny a dráhy patogeneze kolorektálního karcinomu	25
1.3.2.1 WNT/ $\beta$ -katenin	25
1.3.2.2 Dráha MAPK	26
1.3.2.3 Dráha fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K)	26
1.3.2.4 <i>TP53</i>	26
1.3.2.5 Dráha TGF- $\beta$	27
1.3.2.6 Nekódující RNA	28
1.3.2.7 Poznámka	28
<b>1.4 Buněčná smrt</b>	29
1.4.1 Nekróza	29
1.4.2 Apoptóza	30
1.4.3 Autofagie	31
1.4.4 Senescence	33
<b>1.5 Mechanizmy rezistence k buněčné smrti u CRC</b>	35
<b>1.6 Irinotekan v léčbě nádorových onemocnění</b>	37
1.6.1 Historie	37
1.6.2 Metabolismus	37
1.6.3 Mechanismus účinku	39

1.6.4 Irinotekan v léčbě nádorových onemocnění	39
<b>Část 2.</b>	41
<b>2.1 Cíle práce</b>	42
<b>2.2 Metodika</b>	43
2.2.1 Buněčné linie a kultivační podmínky	43
2.2.2 Nasazování do testů a ovlivnění	44
2.2.3 Chemikálie	45
2.2.4 Metodika testů	46
2.2.4.1 Test DNA syntézy	46
2.2.4.2 Test WST-1	46
2.2.4.3 Dynamická morfolgie buněk	47
2.2.4.4 Test poškození DNA	47
2.2.4.5 Adheze buněk	48
2.2.4.6 Metylace DNA	48
2.2.4.7 Detekce apoptózy – obecná přítomnost	49
2.2.4.8 Uvolňování cytochromu c z mitochondrií	49
2.2.4.9 Aktivita kaspáz	50
2.2.4.10 Test buněčné signalizace	50
2.2.4.11 Exprese ATM, ATR a CHK kináz	51
2.2.4.12 Aktivita MAPK	51
2.2.4.13 Plazmidová transfekce	51
2.2.4.14 Transkripce <i>TP53</i>	52
2.2.4.15 Test permeabilizace lysozomálních membrán	52
2.2.4.16 Detekce autofagie	53
2.2.4.16.1 Fluorescenční mikroskopie	53
2.2.4.16.2 Exprese vybraných genů spojených s autofagií	53
2.2.4.17 Detekce senescence	54
2.2.4.18 Příprava lyzátů a imunobloting	54
2.2.4.19 RNA interference	55
2.2.4.20 Exprese microRNA	55
2.2.5 Statistická analýza	56
<b>Část 3.</b>	57
3.1. Výsledky	58

3.1.1. Vliv CPT-11 na růstové parametry nádorových i nenádorových střevních buněk	58
3.1.2. Vliv CPT-11 na buněčnou smrt/senescenci	60
3.1.3 Vliv CPT-11 na poškození DNA a specifickou signalizaci	67
3.1.4. Vliv CPT-11 na expresi proteinů TP53 a p16	72
3.1.5. Úloha proteinů TP53 a p16 na CPT-11 vyvolanou apoptózu a senescenci	75
3.1.6. Exprese vybraných miRNA u buněk ovlivněných CPT-11	78
3.2.1 Vliv CPT-11 na růstové parametry a viabilitu nádorových střevních buněk s mutovaným <i>TP53</i>	80
3.2.2 Vliv CPT-11 na buněčnou smrt-apoptózu u nádorových střevních buněk s mutovaným <i>TP53</i>	82
3.2.3 Vliv CPT-11 na specifickou intracelulární signalizaci nádorových střevních buněk s mutovaným <i>TP53</i>	88
3.3.1 Vliv CPT-11 na růstové parametry nádorových střevních buněk s odstraněným <i>TP53</i>	94
3.3.2 Vliv CPT-11 na buněčnou smrt-apoptózu u nádorových střevních buněk s odstraněným <i>TP53</i>	98
3.3.3 Úloha autofagie u nádorových střevních buněk s odstraněným <i>TP53</i> ovlivněných CPT-11	104
3.3.4 Vliv exprese proteinu TP53 na CPT-11 stimulovanou buněčnou smrt u nádorových střevních buněk s odstraněným <i>TP53</i>	113
3.3.5 Význam proteinu BAX v buněčné smrti indukované CPT-11 u nádorových střevních buněk s odstraněným <i>TP53</i>	119
<b>3.2. Diskuze</b>	126
<b>Část 4.</b>	132
<b>4.1. Závěry</b>	133
<b>Část 5.</b>	134
<b>5.1. Seznam použité literatury</b>	135



## Seznam zkratek

<b>5-FU</b>	5-fluorouracil, cytostatikum
<b>ABC</b>	ATP-binding cassette transporters, rodina transmembránových přenašečů
<b>AKT</b>	Ak Strain Transforming, kináza klíčová pro přenos růstových signálů
<b>APAF-1</b>	Apoptotic Protease Activating Factor, regulátor apoptózy
<b>APC</b>	Adenomatous Polyposis Coli, protein zapojený do patogeneze CRC
<b>ATG</b>	Autophagy Related Proteins, proteiny přímo se účastnící autofagie
<b>ATM</b>	Ataxia Teleangiectasia Mutated, druh kinázy
<b>ATP</b>	Adenosin Triphosphate, vysokoenergetická molekula
<b>ATR</b>	Ataxia Teleangiectasia Related, druh kinázy
<b>BAD</b>	Bcl-2-associated death promoter, proapoptotický protein
<b>BAX</b>	Bcl-2-associated X protein, proapoptotický protein
<b>BCL-2</b>	B-cell Lymphoma 2, rodina regulačních proteinů apoptózy
<b>BCL-XL</b>	B-cell Lymphoma-Extra Large, antiapoptotický
<b>BID</b>	BH3 Interacting-domain Death Agonist, proapoptotický protein
<b>BRAF</b>	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B, gen pro malý protein účastnící se přenosu proliferačních signálů buňky
<b>BrdU</b>	Bromodeoxyuridin, analog thimidinu užívaný k detekci proliferujících buněk
<b>CIN</b>	Chromosomal Instability, chromozomální nestabilita
<b>CpG</b>	Úseky DNA bohaté na opakování cytosinu a guaninu
<b>CPT-11</b>	Camptothecin 11 (Irinotekan), cytostatikum, derivát camptothecinu
<b>CRC</b>	Colorectal Carcinoma, kolorektální karcinom
<b>CYP</b>	Cytochrom P450, rodina enzymů
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole, fluorescenční barvivo s vysokou afinitou k DNA
<b>DISC</b>	Death-inducing Signaling Complex, proteinový komplex přenášející signály při apoptóze
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid, nukleová kyselina
<b>DR4</b>	Death Receptor 4 (TRAILR1 – Tumour Necrosis Factor Receptor 1), povrchový receptor důležitý pro apoptózu
<b>DR5</b>	Death receptor 5 (TRAILR2 – Tumour Necrosis Factor Receptor 2), povrchový receptor důležitý pro apoptózu

<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic Acid, chelační činidlo
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor, rodina růstových faktorů
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor, rodina receptorů pro růstové faktory
<b>EGFRi</b>	Epidermal growth Factor Receptor Inhibitors, látky inhibující funkci EGFR, často sloužící jako léčivé přípravky
<b>ERK</b>	Extracelular Signal-regulated Kinase, kináza rodiny MAPK
<b>FAP</b>	Familiar Adenomatous Polyposis, onemocnění střeva na genetickém podkladě
<b>FasR/FasL</b>	Fas Receptor, Fas Ligand, receptor a jeho ligand účastníci se apoptózy
<b>FITC</b>	Fluorescein-5-isothiocyanate, fluorescenční barvivo
<b>FOLFIRI</b>	Chemoterapeutický režim s irinotekanem
<b>FOLFOX</b>	Chemoterapeutický režim s oxaliplatinou
<b>H2A.X</b>	Fosforylovaná forma histonu při reakce na poškození DNA
<b>HSP-70, -90</b>	Heat Shock Protein-70, -90, stresový protein účastníci se regulace buněčného cyklu a apoptózy
<b>CHK1,2</b>	Checkpoint Kinase-1, -2, kinázy reagující na poškození DNA
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer, Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
<b>IG-IMRT</b>	Image-Guided Intensity-Modulated Radio-Therapy, adaptivní obrazem naváděná radioterapie s řízenou intenzitou
<b>JNK</b>	C-Jun-N-terminal Kinase, rodina kináz reagujících na buněčné poškození
<b>Ki-67</b>	Proliferační faktor sloužící jako marker buněčného růstu
<b>LAMP-1, -2</b>	Lysosome-associated Membrane Protein 1, 2, proteiny zprostředkovávající autofagii
<b>LC3</b>	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B protein, klíčový protein pro tvorbu autofagosomů, marker autofagie
<b>LOH</b>	Lost Of Heterozygosity, ztráta jedné alely z páru
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase, proteiny účastníci se buněčného růstu či dělení
<b>MDC</b>	Monodansyl-cadaverine, fluorescenční barvivo k detekci autofagie
<b>MKN</b>	Mezinárodní Klasifikace Nemocí, český překlad zahraniční příručky
<b>MMP</b>	Mitochondrial Membrane Potential, měření slouží jako marker apoptózy
<b>MMR</b>	Mismatch Repair, způsob opravy správného párování bazí DNA

<b>MSI</b>	Microsatellite Instability, mikrosatelitová nestabilita, možný projev defektu MMR, nesprávná délka malých repetitivních sekvencí DNA
<b>mTOR</b>	Mammalian Target of Rapamycin, protein sloužící jako centrální regulátor metabolismu buňky
<b>NOR</b>	Národní Onkologický Registr v České republice
<b>p16, p21</b>	Inhibitory cyklin-dependentních kináz, zastavují průběh buněčného cyklu
<b>p38</b>	Kináza z rodiny MAPK
<b>TP53</b>	Klíčový tumor-supresorový protein
<b>p62</b>	Proteinový komplex důležitý pro transport mezi jádrem a cytoplazmou
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr šetrný k buňkám
<b>PI3Ks</b>	Phosphatidylinositol 3-kinases, rodina kináz zapojených do klíčových funkcí buňky (metabolismus, proliferace)
<b>pTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog, protein regulující buněčný cyklus, tumor supresorový protein
<b>RAS</b>	Rat Sarcoma Virus, rodina malých proteinů zapojených do patogeneze kolorektálního karcinomu (K-RAS, N-RAS, H-RAS)
<b>Rb</b>	Retinoblastom, tumor-supresorový protein
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid, polymerní sloučenina klíčová v kódování, dekodování a regulaci genů
<b>siRNA</b>	Small Interfering RNA, malá molekula RNA účastnící se regulace genové exprese
<b>SMAD4</b>	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4, protein zapojený do přenosu proliferčních signálů
<b>SN-38</b>	Aktivní forma irinotekanu
<b>SN-38G</b>	Glukuronidovaná forma SN-38
<b>TGF-<math>\alpha</math>, -<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor alpha, beta, členové rodiny EGF faktorů
<b>TNM</b>	Způsob klasifikace onkologických onemocnění (Tumor, Nodes, Metastasis)
<b>UGT</b>	Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase, enzym metabolizující SN-38
<b>UICC</b>	Union for International Cancer Control, Unie pro mezinárodní kontrolu rakoviny, též organizace vydávající TNM klasifikaci
<b>ÚZIS ČR</b>	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky
<b>VEGF<sub>i</sub></b>	Inhibitor vaskulárního růstového faktoru, látky sloužící často jako léčiva
<b>WHO</b>	World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace

**WNT** Wingless-related integration site, rodina proteinů účastnících se patogeneze  
CRC

Poznámka: Geny kódující příslušné proteiny jsou v textu rozlišeny kurzívou.

## Část 1.

## 1.1 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.

## Summary

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.

## 1.2 Úvod

### 1.2.1 Kolorektální karcinom

#### 1.2.1.1 Epidemiologie

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.(Ferlay 2012)

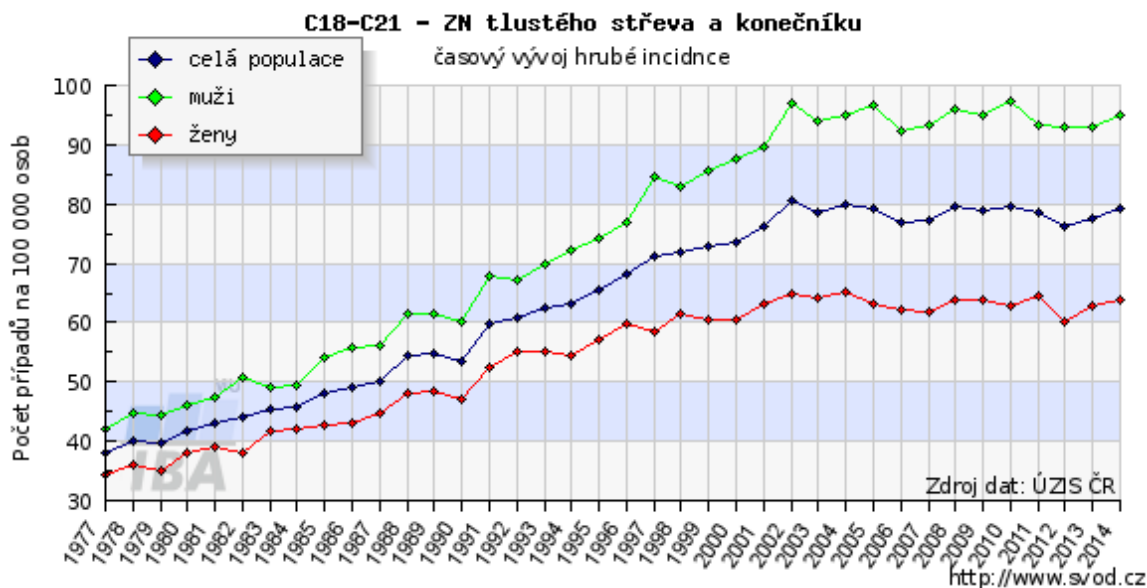
Dle Národního onkologického registru (NOR) se Česká republika bohužel řadí celosvětově na přední příčky v incidenci některých nádorových onemocnění (adenokarcinom pankreatu, tumory ledviny), a to včetně CRC. V České republice se incidence tohoto onemocnění staví u mužů na 2. příčku po karcinomu prostaty, u žen potom zaujímá také 2. příčku po nádoru prsu. Nutno dodat, že uvedené pořadí platí pouze při vynechání diagnózy Jiného zhoubného novotvaru kůže (MKN C44) dle Mezinárodní statistické klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů (ÚZIS ČR 2017 – online [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz)). Každý rok je tak v České republice diagnostikováno asi 8 tisíc nových případů kolorektálního karcinomu, asi 4 tisíce pacientů tomuto onemocnění podlehnou.(Dušek *et al.* 2005)

Zajímavé rovněž je to, že celosvětově je incidence CRC vyšší u žen, ale v České republice je to naopak u mužů. Tento fakt se dával do souvislosti s masivní konzumací piva, která je výraznější u mužské populace, avšak statisticky se tato souvislost nikdy nepotvrdila.(Phipps *et al.* 2017)

V rámci České republiky je nejvyšší incidence CRC hlavně v západočeském regionu, jasná souvislost s vlivy prostředí (opět tradičně významné postavení této části republiky v produkci a konzumaci piva) však potvrzena nebyla.(Phipps *et al.* 2017; Rameš *et al.* 2007)

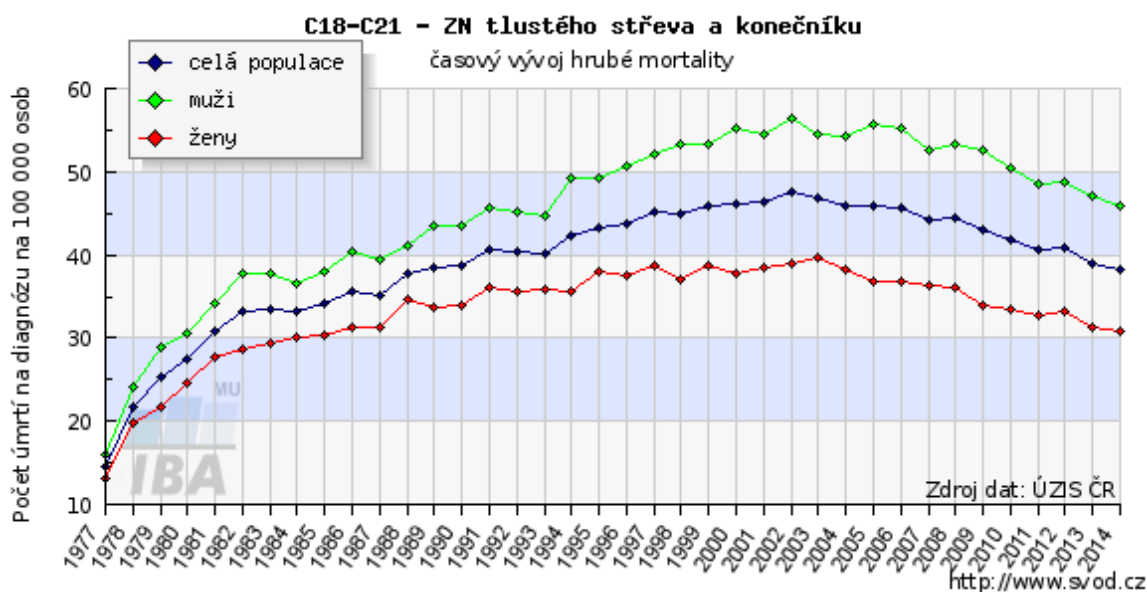
Právě pro masivní výskyt kolorektálního karcinomu byla Česká republika jednou z prvních zemí, kde bylo zavedeno systematické vyšetřování rizikové populace (tzv. screening). Od roku 2008 mají bezpříznakoví občané České republiky po 50. roce věku v rámci preventivních prohlídek zdarma 1x ročně kontrolu výskytu okultního krvácení ve stolici, po 55. roce věku potom kontrolní sigmoideoskopii nebo pankolonoskopii (v případě negativního nálezu je kontrolní kolonoskopie opakována za 10 let).(Dušek *et al.* 2005)





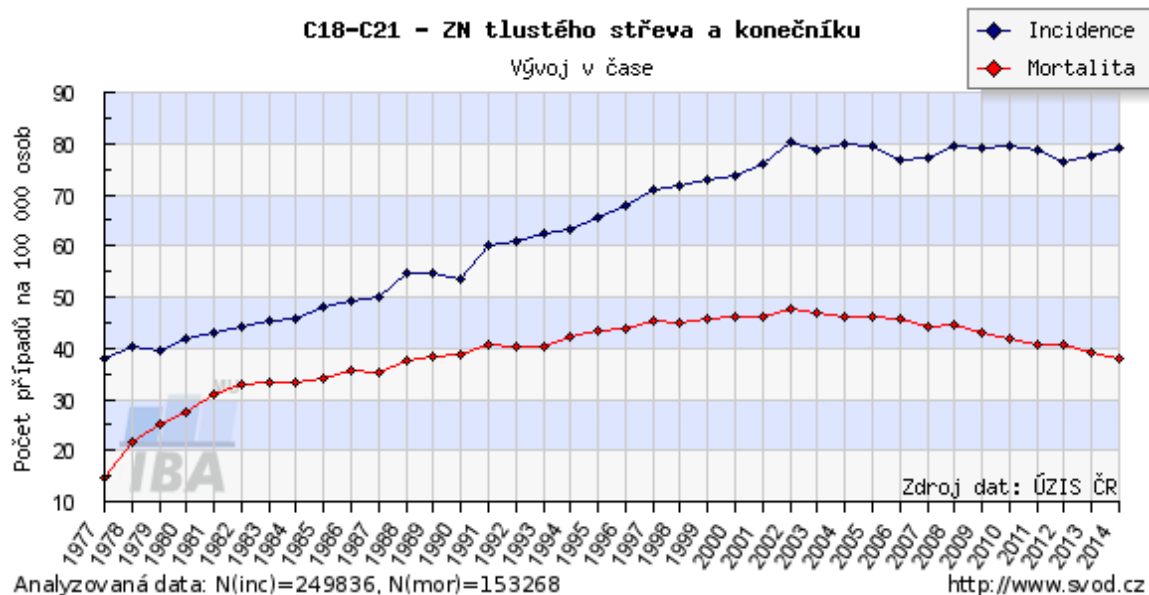
Obr. 1: Časový vývoj incidence CRC na území České republiky

\* převzato z dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, dostupné na: [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz)

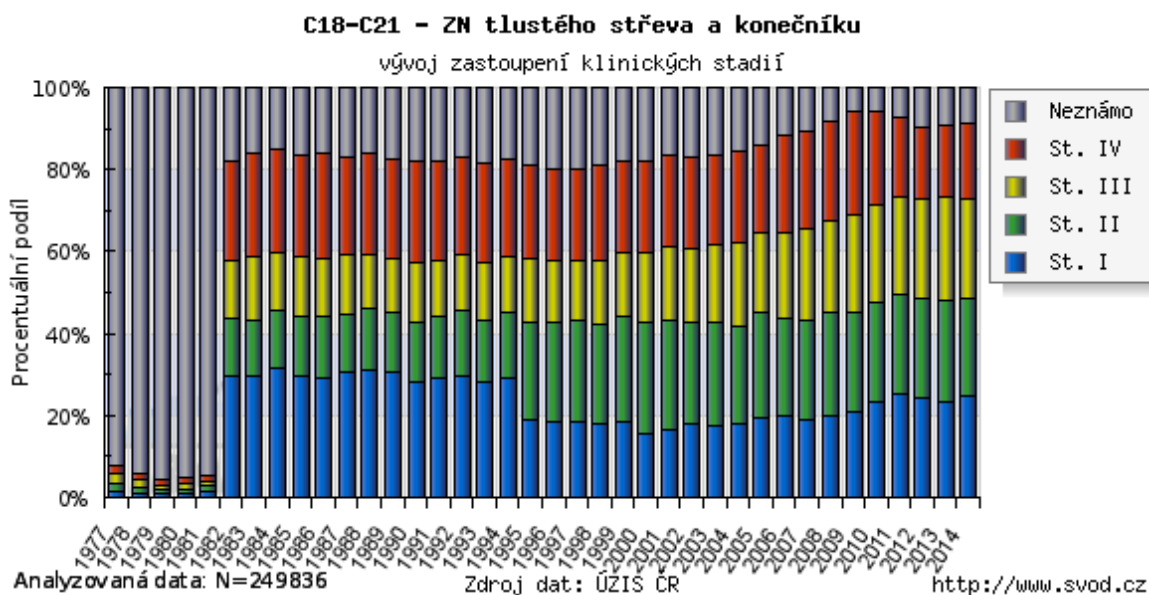


Obr. 2: Časový vývoj mortality CRC na území České republiky

\* převzato z dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, dostupné na: [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz)



Obr. 3: Porovnání časového vývoje incidence a mortality CRC na území České republiky  
\* převzato z dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, dostupné z: [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz)



Obr. 4: Časový vývoj jednotlivých klinických stadií CRC na území České republiky  
\* převzato z dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, dostupné z: [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz)

### 1.2.1.2 Rizikové faktory

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) V této souvislosti se do popředí zájmu dostává složení střevního mikrobiomu (bakteriální rody *Bacteroides*, *Fusobacterium*) a právě jeho vztah k chronickým střevním zánětům a vzniku CRC. (Boleij *et al.* 2015; Kostic *et al.* 2013) Přesné příčiny a souvislosti mezi všemi rizikovými faktory se bohužel ale zatím objasnit nepodařilo. (Rameš *et al.* 2007) Vyvarování se některým rizikovým faktorům patří k primární prevenci, která si klade za cíl snížení výskytu tohoto zhoubného nádoru a nádorů obecně. Též se stále více prokazuje pozitivní vliv některých hlavně nutričních součástí, jakými jsou například ořechy či káva, kyselina acetylsalicylová nebo vitamín D. V neposlední řadě má prokázaný pozitivní vliv i přiměřená a pravidelná fyzická aktivita. (Rameš *et al.* 2007; Sehdev and O'Neil 2015)

### 1.2.1.3 Patogeneze

Hlavní funkcí tlustého střeva je transport elektrolytů a vody, a tím formování stolice. Sliznice tlustého střeva tvoří klky, je vystlána jednořadým cylindrickým epitelem místy uspořádaným do žlázových struktur v podobě Lieberkūnových krypt. Nejčastějším buněčným typem jsou kolonocyty a pohárkové buňky, na dně Lieberkūnových krypt potom multipotentní zárodečné buňky. 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 expanze 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). Dle této klasifikace se určuje adekvátní léčba i odhad prognózy onkologicky nemocných. Z histopatologického hlediska se z 90 % jedná o adenokarcinomy (adenokarcinom klasického vzhledu, mucinózní adenokarcinom, karcinom z buněk vzhledu pečetního prstene)

vznikající ze sliznice tlustého střeva. Mezi méně zastoupené typy potom patří skvamózní karcinomy, neuroendokrinní tumory, lymfomy nebo nediferencované tumory, jejichž původ se dá určit jen obtížně. Adenokarcinomy typicky tvoří žláznaté struktury, jejichž podoba je základem určování histologického grade (stupně ztráty podobnosti s původní tkání), viz níže.(Sobin *et al.* 2009)

Histopatologický stupeň diferenciacce nádoru (grading) dle TNM 7:

GX – stupeň diferenciacce nelze hodnotit

G1 – dobře diferencovaný

G2 – středně diferencovaný

G3 – nízce diferencovaný

G4 – nediferencovaný

Staging

Pro určení pokročilosti kolorektálního karcinomu (staging) platí obecná pravidla TNM klasifikace, která upravuje obecně závazná a pravidelně aktualizovaná příručka, vydávaná UICC (Union for International Cancer Control).

TNM klinicko-patologická klasifikace

T primární nádor

TX primární nádor nelze hodnotit

T0 bez známek primárního nádoru

Tis karcinom in situ, intraepiteliální nebo invaze do lamina propria mucosae

T1 nádor postihuje submukózu

T2 nádor postihuje tunica muscularis propria

T3 nádor postihuje subserózu, nebo se šíří do neperitonealizované perikolické tkáně

T4a nádor prorůstá na viscerální peritoneum

T4b nádor postihuje jiné orgány či struktury

N regionální mízní uzliny

NX regionální mízní uzliny nelze hodnotit

N0 regionální mízní uzliny bez metastáz

N1a metastáza v 1 regionální uzlině

N1b metastáza ve 2-3 regionálních mízních uzlinách

N1c satelity, v subseróze či perirektální tkáni bez metastáz v regionální mízní uzlině

N2a metastázy ve 4-6 regionálních mízních uzlinách

N2b metastázy v 7 a více regionálních mízních uzlinách

poznámka: histologické vyšetření vzorků z regionální lymfadenektomie má standardně zahrnovat 12 a více mízních uzlin

M vzdálené metastázy

MX vzdálené metastázy nelze hodnotit

M0 bez vzdálených metastáz

M1a metastázy omezené na 1 orgán (játra, plíce, vaječník, neregionální mízní uzliny)

M1b metastázy ve více než jednom orgánu nebo na peritoneu

\* převzato a upraveno ze:

Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., Wittekind, CH., *TNM klasifikace zhoubných nádorů*, 7. vydání (2009), česká verze 2011, A John Wiley and sons, LTD., Publication)(Sobin *et al.* 2009)

Tato klasifikace tedy rozděluje kolorektální karcinom do stádií, která též odrážejí prognózu onemocnění a předurčují i postup v následné léčbě.(Sobin *et al.* 2009; Vyzula 2017)

## 0. Stádium

TisN0M0

léčba je primárně chirurgická (lokální excize, polypektomie), adjuvantní chemoterapie není indikována

## I. Stádium

T1-2N0M0

široká excize s anastomózou, adjuvantní chemoterapie není indikována

## II. Stádium

T3-4N0M0

široká excize s anastomózou

neoadjuvantní chemoradioterapie u tumorů rekta

adjuvantní chemoterapie při rizikových faktorech

### III. Stádium

Jakékoliv T, N1, N2, M0

široká excize s anastomózou

neoadjuvantní chemoradioterapie u tumorů rekta

adjuvantní chemoterapie

### IV. Stádium

jakékoliv T, jakékoliv N, M1 nebo lokálně pokročilé inoperabilní onemocnění

paliativní chemoterapie +/- biologická léčba

#### 1.2.1.4 Léčba

Zásady léčby jsou zpracovány do standardizovaných postupů dle dostupných důkazů založených hlavně na statisticky validních klinických studiích. Pro Českou republiku jsou tyto doporučené postupy shrnuty v tzv. Modré knize České onkologické společnosti (dříve Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění), která je aktualizována minimálně 1x ročně.(Vyzula 2017)

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, ponejvíce inhibitory vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGFi) – bevacizumab/aflibercept, či receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFRi) – panitumumab/cetuximab. Tato léčba si ale neklade za cíl pacienta vyléčit, ale zejména snížit celkový objem nádoru a tím oddálit fatální průběh tohoto onemocnění či zmírnit jeho projevy.

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) Stále však chybějí přesvědčivé prediktivní a prognostické znaky, které by pomohly identifikovat vhodné pacienty pro tuto velmi specificky cílenou léčbu.(Noel 2017)

Radioterapie je vyčleněna jako lokální léčba zejména u tumorů rekta (pro zlepšení lokální kontroly a zmenšení nádorového objemu) či při paliativním ozáření bolestivých metastáz různé lokalizace, případně ke zmírnění projevů metastatického postižení v centrálním nervovém systému.(Vyzula 2017)

## 1.3 Molekulární mechanismy vzniku kolorektálního karcinomu

### 1.3.1 Rozdělení

Vznik kolorektálního karcinomu je spojen s nahromaděním genetických a též epigenetických změn, které vedou k deregulaci drah ovlivňujících například buněčnou proliferaci, diferenciaci či buněčnou smrt a následně k přeměně normálního střevního epitelu v invazivní adenokarcinom.

Tyto mutace zasahují cílové onkogeny, tumor-supresorové geny a geny podílející se na opravě DNA.

Podle mechanismu vzniku těchto mutací rozlišujeme kolorektální karcinom vzniklý 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. (Simons *et al.* 2013)

Většina případů CRC vykazuje chromosomální nestabilitu (CIN), tedy variabilní počet chromozomů v nádorových buňkách (aneuploidie) a ztrátu heterozygoty (LOH). Postiženy jsou klíčové geny udržující buněčnou integritu, např. *APC*, rodina *RAS*, *PI3K*, *TP53* či *SMAD4*. Záradečné mutace těchto genů mohou vést k familiárnímu výskytu kolorektálního karcinomu, např. mutace tumor supresorového genu *APC* způsobující familiární adenomatózní polypózu (FAP). (Marmol *et al.* 2017)

Tumory s mikrosatelitovou nestabilitou (MSI) vykazují poruchu exprese genů aparátu opravujícího chybné párování bazí DNA při replikaci (mismatch repair geny – *MMR*), konkrétně *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* a *PMS2*. To má za následek velký nárůst chybovosti replikace zejména v tzv. mikrosatelitech, tedy nekódujících úsecích DNA o velikosti 2-5 párů bazí, posun čtecího rámce při transkripci DNA v klíčových tumor supresorových genech či onkogenech a tím k dalšímu hromadění mutací v dalších důležitých genech (mutátorový fenotyp). (Loeb 2016) Nefunkčnost tohoto aparátu může být způsobena mutací *de novo* (hypermetylace promotoru konkrétního *MMR* genu) či zděděnou zárodečnou mutací (např. u Lynchova syndromu). (Lindor 2014) Bylo však zjištěno, že tyto tumory mají v raných stádiích lepší prognózu ve srovnání s nádory vzniklými na základě CIN, nejspíše z důvodu zvýšené imunogenicity a následně větší kontroly ze strany imunitního systému. (Kawakami *et al.* 2015)

Na vzniku kolorektálního karcinomu se podílejí též epigenetické změny. Zahrnují hlavně hypermetylacii promotorových částí tumor supresorových genů, jejich umlčení a tím ztrátu



exprese.

Epigenetické změny můžeme sledovat u tumorů vzniklých oběma předcházejícími způsoby, například u sporadických MSI CRC vzniklých na podkladu metylace promotoru *MLH1* detekujeme mutaci V600E klíčového onkogenu *BRAF*. Tato mutace nám tedy slouží jako diagnostický test k určení rodin a jedinců vhodných k dalšímu sledování, zároveň pacienti s touto mutací mají horší prognózu a hůře odpovídají na stávající terapii. (Parsons *et al.* 2012) (Kostic *et al.* 2013)

### 1.3.2 Klíčové geny a dráhy patogeneze kolorektálního karcinomu

#### 1.3.2.1 WNT/ $\beta$ -katenin

První poznatky týkající se molekulárně genetických změn v nádorových buňkách vedly v devadesátých letech minulého století k formulování tzv. „tradiční cesty“ patogeneze kolorektálního karcinomu, která popisuje jeho vznik z benigního adenomu. Tato dráha (označována také jako kanonická) má za úkol udržovat cestou signalizace ligandu WNT v kmenových epiteliálních buňkách tlustého střeva na dně Lüberkühnových krypt vysoké hladiny  $\beta$ -kateninu, který po své translokaci do jádra působí jako kotranskripční faktor. To nutí tyto buňky opakovaně se dělit a zajišťovat tak obnovu opotřebovávaných kolonocytů. Aktivita této dráhy v kolonocytech slábne spolu s jejich migrací směrem vzhůru do lumina tlustého střeva a kolonocyty se diferencují. Jak WNT signalizace slábne,  $\beta$ -katenin je fosforylován a odstraňován z cytoplazmy komplexem proteinů složeným z APC, konduktinu, proteinové fosfatázy 2A, glykogensyntáz-kinázy 3 a -kinázy 1 $\alpha$ . (Arends 2000)

Nejčastěji mutovaným genem této dráhy u CRC bývá *APC*. Tuto mutaci nacházíme též u většiny adenomů, což svědčí pro její roli v časných fázích onemocnění. Tato mutace způsobí neschopnost APC vázat  $\beta$ -katenin a odstraňovat ho z cytoplazmy. Významným partnerem  $\beta$ -kateninu v této dráze je například transkripční faktor c-MYC, jehož signalizací je ovlivněna proliferace či buněčná smrt (napojení na proteiny TP53, Rb, RAS). (Ciznadija *et al.* 2009; He *et al.* 1998; Rennoll and Yochum 2015)

S poruchou dráhy WNT je též spojeno oslabení mezibuněčných spojů typu tight-junction (zonula occludens), mající za následek poruchu buněčné adheze a snadnější migraci a potenciální metastazování nádorových buněk. (Brocardo and Henderson 2008)

### 1.3.2.2 Dráha MAPK

Tato dráha patří k nejčastěji mutovaným u lidských nádorů obecně. Signalizace se odvíjí od membránového receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR, ERBB-1, HER1), který po stimulaci růstovým faktorem (EGF, TGF $\alpha$ ) vykazuje tyrozinkinázovou aktivitu. Signál se cestou transdukčních proteinů RAS, RAF, MEK a ERK dostává až do jádra, kde působí aktivaci transkripčních faktorů, např. c-JUN, ale též například proteinu TP53. Tato dráha zabezpečuje průchod buněčným cyklem a proliferaci po stimulaci vnějšími signály. Aktivační mutace nalézáme nejčastěji v genech pro malé G-proteiny KRAS (40 % CRC) a BRAF (10 % CRC), což způsobí trvalou aktivaci signální dráhy bez ohledu na stimulaci cestou receptoru. (Van Krieken *et al.* 2016)

Testování mutací v těchto genech je též nutné k určení vhodné a účinné terapie pacientů s generalizovaným CRC, protože vzájemně exkluzivní mutace genů *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* jsou spojeny s určitou rezistencí k léčbě. (Morkel *et al.* 2015) Nejčastější aktivační mutace genu *BRAF* V600E je pravděpodobně též spojena s horší prognózou onemocnění. (Ahn *et al.* 2014; Sanz-Garcia *et al.* 2017)

### 1.3.2.3 Dráha fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K)

Ačkoliv alterace této dráhy můžeme pozorovat asi u 40 % případů CRC, před léčbou standardně nedochází k testování konkrétních mutací a zároveň i terapeutické zacílení je omezeno pouze na klinické studie. Tato dráha zahrnuje ligandem zprostředkovanou aktivaci membránového receptoru s tyrozinkinázovou aktivitou (např. dobře známý EGFR) či aktivaci cestou RAS a fosfatidylinositol-trifosfátu (PIP<sub>3</sub>) za účasti dalších známých proteinů jakými jsou např. PTEN, AKT či mTOR. Je opět významná pro stimulaci buněčné proliferace, motility a přežívání a je též úzce spřažena s kontrolou buněčného metabolismu. V patogenezi CRC hraje významnou roli v přechodu z benigních lézí do invazivního karcinomu. (Papadatos-Pastos *et al.* 2015; Samuels and Ericson 2006)

### 1.3.2.4 TP53

*TP53* je gen kódující evolučně konzervovaný transkripční faktor, fungující jako tumor-supresorový protein, který hraje klíčovou roli v zástavě buněčného cyklu a proliferace, v metabolismu, v opravě poškozené DNA a případně v indukci buněčné smrti. Pro tyto

komplexní funkce se označuje jako „strážce genomu“. (Lane 1992) Exprese, aktivace i intracelulární kompartmentace TP53 proteinu jsou regulovány na mnoha úrovních, přičemž jedním z významných mechanismů představuje jeho interakce s proteinem MDM2, který zpětnovazebně zprostředkovává jeho odstranění ubiquitinací. (Iyer *et al.* 2016)

Jako transkripční faktor ovlivňuje dle své funkce velké množství dalších genů. Například v případě apoptózy je to aktivace jejího průběhu vnitřní i vnější cestou, (např. prostřednictvím zvýšení exprese proteinů BAX, PUMA, NOXA, APAF-1, kaspáza-6, kaspáza-8, BID), či naopak snížením exprese anti-apoptotických signálů v podobě rodiny proteinů BCL-2 (BCL-2, BCL-XL). (Abraha and Ketema 2016; Li *et al.* 2015b) Toto zdánlivě protichůdné působení na pro- a antiapoptotickou signalizaci pomáhá naklonit nastolenou rovnováhu na jednu nebo druhou stranu, tedy zabránit uvolnění nebo naopak pomoci uvolnit cytochrom c z mitochondrií s důsledky v podobě apoptózy nebo přežití buňky. (Kroemer *et al.* 2007)

Regulace průchodu buňky buněčným cyklem je zajišťována interakcí cyklinů a cyklin-dependentních kináz (CDK). TP53 se této kontroly účastní například zastavením buňky v přechodu G1/S fáze, a to díky zvýšení aktivity inhibitoru CDK4/6 p21<sup>(WAF1)</sup>. (Waldman *et al.* 1995)

Je zajímavé, že mutovaný TP53 nejenže přestává plnit své supresorové funkce a tím dává buňce čas na akumulaci dalších mutací, ale dokáže i dále přímo posilovat nádorový fenotyp. (Solomon *et al.* 2018)

TP53 může též zabraňovat přežití buňky inhibicí cesty PI3K/AKT, a tím zpětnovazebně posilovat svou vlastní funkci blokadou proteinu MDM2. (Stambolic *et al.* 2001)

Zárodečné mutace TP53 podmiňují vznik Li-Fraumeni syndromu, charakterizovaného časným výskytem nádorových onemocnění v podobě sarkomů, tumorů prsu či mozkových nádorů. (Merino and Malkin 2014)

U CRC je TP53 mutován až v 80 % případů, popřípadě jsou přítomny poruchy v signalizaci v na TP53 závislých signálních drahách, tyto mutace a poruchy však opět nejsou předmětem klinického testování, protože v současné době není znám jejich praktický prognostický ani léčebný dopad. (McGregor *et al.* 2015; Russo *et al.* 2005)

#### 1.3.2.5 Dráha TGF- $\beta$

Ačkoliv tato dráha zatím postrádá u CRC prognostický či prediktivní význam, chromozomální změny ovlivňující expresi jejích členů se vyskytují často. Jedná se hlavně o LOH v úseku chromozómu 18q týkající se genů SMAD2 a SMAD4. Přirozeným úkolem

těchto proteinů je přenos signálů z vnějšího prostředí (např. dráha ERK/MAPK), aktivace apoptózy či podpora diferenciací buněk. U buněk kolorektálního karcinomu jsou tyto funkce ztrátou příslušného chromozomového úseku alterovány. (Fleming *et al.* 2013; Marmol *et al.* 2017)

#### 1.3.2.6 Nekódující RNA

Malé nekódující úseky RNA představují další možnost regulace buněčných funkcí. Nejlépe prozkoumané jsou v tomto ohledu mikro RNA (miRNA), které přímo interferují s jejich translací nebo přímo indukují jejich degradaci. Prostřednictvím miRNA dochází k ovlivnění exprese řady proteinů spojených s onkogenezí. V souvislosti s CRC jsou zmiňovány zejména miR-21, miR-34a, miR-155, miR-200 či miR-497, ale i mnoho dalších. (Asangani *et al.* 2008; Li *et al.* 2015a; Qiu *et al.* 2016; Wan *et al.* 2016; Yamakuchi *et al.* 2008)

#### 1.3.2.7 Poznámka

Poznatky o molekulární patogenezi kolorektálního karcinomu přibývají každým dnem. Na jejich základě je též zpřesňována i klasifikace tohoto onemocnění. Např. zajímavé je rozdělení nádorů kolorekta dle Consensus Molecular Subtypes (CMS). (Guinney *et al.* 2015) Tato klasifikace se pokouší spojit klinické chování konkrétních tumorů tlustého střeva s jejich molekulární charakteristikou a následně zlepšit možnosti léčby. Následné terapeutické implikace však teprve budou předmětem budoucích klinických studií.

## 1.4 Buněčná smrt

Smrt je přirozenou součástí života prakticky všech organismů, a to jak mnohobuněčných, tak jednobuněčných. Na úrovni buňky poskytl během posledních 50 let intenzivní výzkum v této oblasti velmi zajímavé poznatky. V cytologické i molekulární rovině tak můžeme v průběhu buněčné smrti rozlišit množství událostí, které se mohou vzájemně velmi lišit. Kromě morfologických změn je základním rozdílem též záměrnost celého děje, kdy plánovaná (programovaná) smrt některých buněk je pro celý organismus vlastně nezbytná z hlediska zachování homeostázy a tento proces je velmi přesně řízen a geneticky kódován. (Kroemer *et al.* 2009; Levine and Yuan 2005) Oproti tomu neprogramovaná buněčná smrt probíhá po masivním buněčném poškození, většinou náhle a bez možnosti organismu tento jev jakkoliv ovlivnit. Je tedy pro organismus jako celek vlastně nežádoucí. (Galluzzi *et al.* 2018) K rozlišení, kdy je již buňka mrtvá, a ne třeba jen umírající, se jako všeobecně platná kritéria považuje 1. ztráta integrity buněčné membrány a 2. kompletní fragmentace buňky. (Galluzzi *et al.* 2018) Přesné rozdělení a odlišení jednotlivých mechanismů buněčné smrti je ale stále poměrně obtížné, jednak z důvodu nadále nedokonalých znalostí a v druhé řadě též časté podobnosti a propojenosti z hlediska morfologie i regulace. (Galluzzi *et al.* 2018) Z hlediska nádorové buňky je regulace (a hlavně deregulace) buněčné smrti jedním z klíčových dějů, který musí ovládnout tak, aby si vynutila co nejúčinnější přežívání. Stejně tak z pohledu protinádorové léčby je tato otázka zásadní. (Hanahan and Weinberg 2000) Níže jsou uvedeny vybrané nejvýznamnější typy buněčné smrti, které jsou zároveň i nejlépe prozkoumány, a to zejména ve spojitosti s patogenezí kolorektálního karcinomu.

### 1.4.1 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. Tímto způsobem reaguje buňka na poškození hlavně z vnějšího prostředí, kdy příčinou může být intenzivní trauma buňky způsobené například infekcí, toxiny či následky fyzikálních vlivů. (Galluzzi *et al.* 2018)

Novější poznatky naznačují, že za určitých podmínek by mohly být některé děje provázející nekrózu určitým způsobem regulovány. V takovém případě je tento děj označován různými termíny, nejčastěji však jako nekroptóza. Uplatňuje se při buněčné smrti za účasti imunitního systému aktivací receptorů s doménami smrti („death domain receptors“) či TLR (Toll-like receptory), nebo v případě nefunkčnosti jiných programovaných systémů buněčné smrti jako je apoptóza. (Vandenabeele *et al.* 2010) Ačkoliv je s ní i úzce spojena přes signální proteiny RIPK1 a RIPK3, její přesný průběh je zatím nejasný, na rozdíl od apoptózy ale také končí desintegrací membrány a vyjitím buněčného obsahu do okolí.

(Hitomi *et al.* 2008; Ouyang *et al.* 2012)

#### 1.4.2 Apoptóza

Typické morfologické změny provázející apoptózu buňky byly popsány již v 19. století, avšak tento konkrétní termín byl zaveden až v 70. letech století 20. (Kerr *et al.* 1972) Jedná se o poměrně velmi dobře prostudovaný a pochopený proces, označovaný též jako buněčná sebevražda. 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) Apoptóza se uplatňuje například při odstraňování již nepotřebných buněk během embryonálního vývoje i během dalšího života, při imunologickém dohledu nad T-lymfocyty v rámci jejich maturace v brzlíku člověka nebo například při odstraňování buněk poškozených toxickými vlivy či infekcí. Zásadní je též v nádorovém procesu, kdy nadlimitní aktivace onkogenů může vést k její aktivaci, a to nejčastěji tzv. vnitřní cestou. Imunitní systém se takto poškozené buňky též snaží zničit, tentokrát aktivací vnější cesty apoptózy, zatímco nádorové buňky se vzhledem k mutacím ve svém genomu snaží apoptózu vyřadit z funkce, a tak dále přežít. (Hanahan and Weinberg 2011; Kerr *et al.* 1972)

Buněčná sebevražda je umožněna aktivací proteinů označovanými jako kaspázy (cysteinové aspartát-specifické proteázy), které plní v tomto procesu funkci signální i výkonnou.

(Thornberry and Lazebnik 1998) Samotné spuštění apoptózy může být indukováno cestou vnějších signálů přes membránové receptory (Fas, DR4, DR5), které vedou k formování DISC (Death-inducing Signaling Complex) a aktivaci kaspázy 8, která poté může přímo aktivovat výkonné kaspázy 3 a 7 s následnou degradací buněčných struktur. Další možností je

další přenesení signálu přes transdukční proteiny BCL-2 rodiny (např. BID, BAX a BAD) na mitochondriální apoptotickou cestu.(Wen *et al.* 2012) Rodina BCL-2 v sobě zahrnuje jak proapoptotické signální proteiny, tak proteiny bránící spuštění apoptózy. Jejich poměr pak předurčuje buňku k dalšímu osudu.

Vnitřní cesta apoptózy, jak název napovídá, je většinou výsledkem nitrobuněčného stresu, na který buňka, pokud se není schopná s důsledky tohoto stresu vyrovnat, zareaguje spuštěním sebezničujícího programu. Tento program zahrnuje typicky kaskádovitou aktivaci celé řady molekul, ale zejména proapoptických signálních proteinů rodiny BCL-2. V rámci této signalizace se mohou uplatňovat různé buněčné kompartmenty (organely), z nichž však zásadní roli hrají právě mitochondrie. Jejich vnější membrána se stává propustnou pro cytochrom c, který v cytosolu po spojení s Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) a ATP formuje apoptozóm. Tento komplex aktivuje pro-kaspázu 9 na její aktivní formu. Na konci tohoto procesu jsou opět aktivní kaspázy 3 a 7 vykonávající přesnou degradaci buněčného obsahu.(Green and Llambi 2015; Tsujimoto 1998; Zou *et al.* 1997)

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. (Benchimol 2001; Ouyang *et al.* 2012)

### 1.4.3 Autofagie

Autofagie je evolučně silně konzervativní a přísně geneticky kontrolovaný děj recyklace částí buněk. Jeho intenzita je zvýšena v případě, že organismus z různých příčin energeticky strádá.(Levine and Klionsky 2004) Ač je tento jev znám více jak 50 let, do popředí zájmu se autofagie dostala na konci 20. století ve spojení s novými poznatky týkajícími se programované buněčné smrti.(Hanahan and Weinberg 2000; Huang and Klionsky 2002) V případě zvýšeného buněčného stresu se omezí či zastaví většina aktivit včetně cyklování. Vystupňuje se autofagický flux, který má podpořit energetický metabolismus buňky a zabezpečit její další přežití. 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)

Stále je otázkou, zda je autofagie pouze jev doprovázející buněčnou smrt, kdy se buňka recyklací svých organel snaží této smrti zabránit, nebo se naopak jedná o přímý mechanismus buněčné smrti a autofagie celou buňku zevnitř stráví.(Levine and Yuan 2005)

Obecně jsou popsány 4 druhy autofagie, které se vzájemně mírně liší svým průběhem i funkcí. (Cesen *et al.* 2012; Huang and Klionsky 2002; Levine and Klionsky 2004; Tsujimoto and Shimizu 2005) Jedná se makroautofagii, mikroautofagii, chaperonem zprostředkovanou autofagii a mitofagii.

Makroautofagie je proces degradace buněčného materiálu obklopením dvojitou membránou (fagofor) a postupným vytvořením autofagozomu, který následně splyne s lysozomem a obsah tohoto váčku je degradován.(Levine and Yuan 2005; Mizushima and Komatsu 2011)

Při mikroautofagii se buněčný obsah, který má být stráven, dostane přímo do lysozomu invaginací jeho membrány a následně je uvnitř lysozomu degradován.(Levine and Yuan 2005)

Chaperonem-zprostředkovaná autofagie je velmi specifický proces, v rámci kterého je cílový degradovaný protein označen rozpoznávací chaperonovou sekvencí HSP-70 či HSP-90 následně je internalizován do lysozomu za účasti s lysozomem-asociovaného membránového proteinu typu 2-A (LAMP-2A). Tento transport do lysozomu je velmi selektivní.(Bandyopadhyay *et al.* 2008)

Mitofagie označuje proces degradace mitochondrií poškozených během buněčného stresu. Řízené zničení mitochondrií tak brání jejich hromadění v buňce a následnému buněčnému poškození.(Youle and Narendra 2011)

Obecně se jako autofagie označuje proces makroautofagie, který je také nejlépe prozkoumán. Autofagie je regulována aktivací specifických s autofagií spojených genů (*ATG*), které jsou evolučně silně konzervované. Zatím jsou známy dvě hlavní aktivační cesty autofagie, AIT-5/7 závislá a nezávislá cesta. (Marinkovic *et al.* 2018)

První z nich vede na základě nutričních podnětů k potlačení aktivity komplexu proteinů mTORC1, což podnítlí translokaci dalšího proteinového komplexu ULK do fagoforu a aktivací proteinů PI3K, BEKLIN-1 dojde k formaci autofagozomu. Proteiny ATG-5 a -7 se spolu s jinými váží na protein LC3, což vede již k formaci zralého fagosomu (maturace) s možností splynutí s lysozomem. (Nishida *et al.* 2009)

Na ATG-5/7 nezávislá (alternativní) cesta je též podmíněna proteinovými komplexy ULK, PI3K či proteinem BEKLIN-1. Formace fagoforů a následná maturace je však zajištěna aktivitou RAB9, který za jiných okolností ovlivňuje pohyb proteinů z endozomů do Golgiho aparátu. (Riederer *et al.* 1994)



Spuštění autofagie je regulováno buněčnými senzory odpovídajícími na změnu homeostázy, např. stresem spojeným s deplecí energie či glukózy nebo hypoxií. (Kroemer *et al.* 2010) Mezi tyto regulační proteiny patří například BEKLIN-1 (ATG-6), kinázy mTOR či AMPK, a to i prostřednictvím napojení na další regulační dráhy spojené například s buněčnou smrtí. (Cheng *et al.* 2013; Kaur and Sharma 2017)

Ovlivnění mTOR se ukázalo jako nadějně při léčbě nádorových onemocnění. Jeho inhibice je schválenou terapií v případě pokročilých tumorů ledviny a neuroendokrinních tumorů (inhibitory everolimus, temsirolimus). (Cho *et al.* 2007) Další studie se pokoušejí určit terapeutický význam této dráhy i v léčbě kolorektálního karcinomu (Koustaš *et al.* 2017), výsledky jsou však stále velmi rozporuplné a dokonce protichůdné. Například exprese proteinu BEKLIN-1 v nádorové tkáni byla ve srovnání se zdravou mukózou vyšší, dále jeho množství v nádorové tkáni korelovalo s větší invazivitou, metastazováním a celkově horší prognózou. (Zhang *et al.* 2014) Jiná studie opět statisticky silně prokázala úplný opak, a to, že exprese BEKLIN-1 koreluje s delším celkovým přežíváním. (Yang *et al.* 2015)

#### 1.4.4 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. (Munoz-Espin and Serrano 2014)

Buňka podstupuje změny, kterými v ideálním případě dává najevo zbytku organismu, že ztratila svoji funkci a mělo by dojít k její likvidaci. V tomto případě je její účel vlastně shodný s apoptózou, i signalizace a regulace může vykazovat podobnost – např. kritická role proteinu TP53 či zástava buněčného cyklu prostřednictvím proteinu p16<sup>(INK4a)</sup>. (Beausejour *et al.* 2003; Campisi and d'Adda di Fagagna 2007)

Tento proces se týká hlavně dělicích se buněk. Jejich dělicí aktivita je limitována tzv. Hayflickovým limitem, tedy délkou telomer a jejich zkracováním po každém dělení. (Hayflick and Moorhead 1961) Tato příčina je však pouze jednou z mnoha. Jak se zdá, senescence se účastní řady fyziologických dějů, má také velký význam při patologických procesech včetně nádorového růstu. Senescence se uplatňuje jako mechanismus bránící nádorovému růstu v jeho časných stádiích. V případě, že senescence nevede k odstranění poškozených buněk z tkáně, zvyšuje se riziko jejich zvrhnutí na buňky nádorové. (Gorgoulis and Halazonetis 2010;

Munoz-Espin and Serrano 2014) Nádorové buňky, které následně uniknou buněčné smrti i senescenci, pak často vykazují velmi agresivní fenotyp.(Yang *et al.* 2017)

Dosud není k dispozici jednotná definice buněčné senescence, obecně se však uznává několik charakteristik, které senescentní buňka vykazuje, jako například absence proliferačních markerů (Ki-67), produkce se senescencí asociované  $\beta$ -galaktosidázy (SA $\beta$ GAL) či lipofuscinu (Georgakopoulou *et al.* 2013), exprese tumor supresorových genů a inhibitorů buněčného cyklu. (Munoz-Espin and Serrano 2014)

Mikroskopicky *in vitro* pozorujeme změnu buněčného tvaru s typickým růstem hlavně do šířky, oploštění buněk a jejich vakuolizaci, v jádře potom tzv. se senescencí-asociované heterochromatinové foci. (Munoz-Espin and Serrano 2014)

Jak bylo zmíněno výše, senescence může být aktivována nejen přílišným zkrácením telomer, ale též například oxidačním stresem způsobeným chemoterapií či radioterapií, poškozením DNA či aktivací onkogenů nebo ztrátou funkce tumor supresorových proteinů. (Gorgoulis and Halazonetis 2010; Munoz-Espin and Serrano 2014)

## 1.5 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. Buňky jsou ze střevního lumen vystaveny mnoha stresovým faktorům jako jsou potenciálně toxické látky, hypoxie či bakterie. Jiné tkáně by na tuto stimulaci mohly reagovat poškozením a následnou smrtí. (Huang and Yu 2015) Ve střevním epitelu jsou funkční netypické strategie přežití těchto buněk, jako např. zvýšené vstřebávání glukózy s následnou aktivací PI3K/AKT a proliferačního faktoru NF $\kappa$ B (Yu *et al.* 2005). Zvýšené vstřebávání glukózy, které je v buňkách CRC ještě vystupňováno, spolu s jejím odlišným metabolismem, vede například k rezistenci vůči hypoxií indukované nekroptóze, a to znemožněním uvolnění volných radikálů z mitochondrií. (Huang *et al.* 2013)

Dále se v nádorových buňkách více uplatňuje vychytávání a neutralizace volných radikálů antioxidantními systémy, např. prostřednictvím redoxních enzymů (kataláza, superoxid-dismutáza, glutathion-reduktáza). (Riaz *et al.* 2002)

Jinou metabolickou adaptací, kterou mohou využít buňky CRC, je zvýšené vstřebávání glutaminu, které vede k potlačení apoptózy, aktivaci autofagie a stresových heat-shock proteinů. (Ban and Kozar 2010) Zároveň jsou ovlivněny regulační proteiny v čele s členy rodiny BCL-2 a IAP, dochází tedy k aktivaci antiapoptotických a k potlačení proapoptotických signálů vedoucí k supresi exekuční fáze smrtícího procesu. Tyto změny se uplatňují zejména ve fázi přechodu vznikajícího nádoru ze stádia adenomu do adenokarcinomu či po ovlivnění nádorové tkáně chemoterapeutiky. (Iacopetta 2003)

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, NF $\kappa$ B), 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) Dichotomní charakter regulace TP53 se však projevuje i v tomto případě. Nahromadění TP53 v cytoplazmě působí spíše proti autofagii, ale jeho přítomnost v jádře působí proautofagicky. Dalo by se říci, že tento protein udržuje úroveň autofagie v buňce na přijatelné úrovni tak, aby byla zachována maximální viabilita buňky a tato nebyla ohrožena sebeustrávením a na druhé straně úplným vyčerpáním energetických zásob. (Marinkovic *et al.* 2018) U nádorových buněk je tato funkce eskalována i z hlediska změněného metabolismu a velkého selekčního tlaku v nádorovém mikroprostředí. (Abida and Gu 2008) Klinicky i experimentálně je prokázáno agresivnější chování nádorů tlustého střeva s vystupňovanou autofagií, naproti tomu role autofagie při vzniku CRC zůstává nadále nejasná. (Galluzzi *et al.* 2015)

Kontroverze panuje například u klíčového autofagického proteinu BEKLINU-1, jehož exprese je dle některých studií u buněk CRC zvýšená a spojená s horší prognózou (Zhang *et al.* 2015), dle jiných je jeho exprese spojena s delším přežíváním pacientů. (Yang *et al.* 2015) Alterace v procesu autofagie byly zaznamenány i na jiných místech tohoto procesu, jmenovitě zvýšená exprese proteinu LC3 a ATG-10 či snížená u proteinu AtTG-5. (An *et al.* 2011) Resistence k buněčné smrti nádorových buněk je ale ovlivňována i celkově z vnějšku, a to nádorovým mikroprostředím. Jako příklad může sloužit parakrinní sekrece prozánětlivých faktorů cyklooxygenázy 2 (COX-2) či prostaglandinu E (PGE-2). Kromě přímé stimulace proliferace syntézou růstových faktorů je též potlačena apoptóza indukovaná FAS cestou zvýšení exprese IAP. (Nishihara *et al.* 2003)

## 1.6 Irinotekan v léčbě nádorových onemocnění

### 1.6.1 Historie

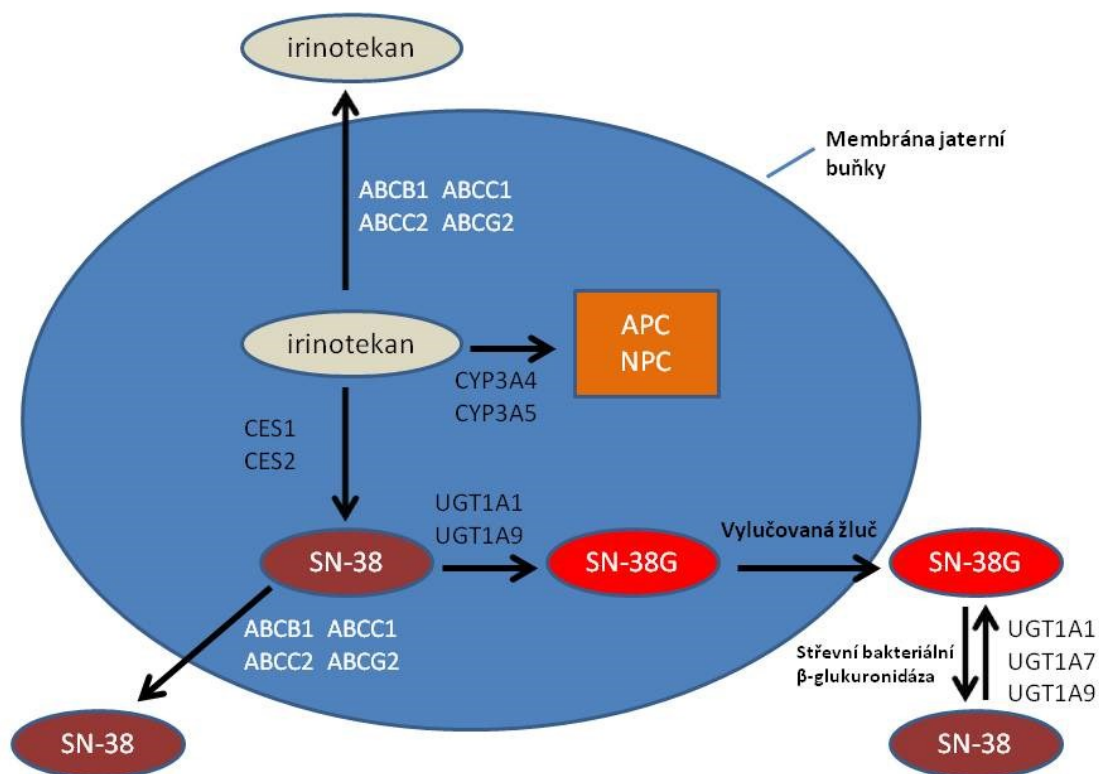
Irinotekan (CPT-11), 7-ethyl-10[4-(1-piperidino)-1-piperidino-carbonyloxycamptothecin je polysyntetický derivát alkaloidu camptothecinu (CPT) získávaného ze stromu *Camptotheca acuminata* sp., jehož kůra se intenzivně využívá hlavně v tradiční čínské medicíně pro svoje protinádorové účinky. CPT se pod vědecký drobnohled dostal krátce po svém objevu v USA v roce 1966.(Chabot, 1997) CPT-11 jako jeho derivát byl však poprvé syntetizován až o 30 let později v 90. letech 20. století a řadí se tak například spolu s oxaliplatinou nebo temozolomidem k novějším cytostatikům, které v současnosti patří mezi základní chemoterapeutické prostředky v boji proti nádorovým onemocněním. (Wall and Wani 1996)

### 1.6.2 Metabolismus

V lidském těle je CPT-11 po intravenózním podání komplexně metabolizován za účasti mnoha enzymů a transportních proteinů.

Tento metabolismus je 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.

Enzymy z řady cytochromů P450 se mohou podílet na přeměně CPT-11 na neaktivní metabolity (APC, NPC). Dále mohou být CPT-11 a jeho metabolity eliminovány z buněčného prostředí pomocí nejrůznějších transportních mechanismů spojených především s transportním transmembránovým proteinem adenosin-triphosphate-binding cassette (ABC). 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. (Hahn *et al.* 2006; Chabot 1997; Mathijssen *et al.* 2001)



Obr. 5: Metabolismus CPT-11 v játrech

Změna CPT-11 na jeho aktivní formu (SN-38) je umožněna karboxyesterázami (CES1 a 2). Inaktivace SN-38 glukuronidací (SN-38G) se účastní uridin-difosfát-glukuronosyltransferázy (UGT1A1 a 1A9).

SN-38G je vylučován žlučí do střeva. Tam je možná opětovná konverze bakteriální β-glukuronidázou na SN-38.

Mimojaterní část SN-38 je metabolizována na neaktivní SN-38G enzymy UGT1A1, 1A7 a 1A9. Cytochrom P450 (CYP3A4, 3A5) mění CPT-11 na dále neaktivní metabolity (APC, NPC). Enzymy ABC podporují transport SN-38 mimo jaterní buňku.

\* převzato a upraveno z:

Hahn et al., *Pharmacogenetics and irinotecan therapy*, American Journal of Health-system Pharmacy (2006) Nov 15, 63(22):2211-7  
(Hahn et al. 2006)

### 1.6.3 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku irinotekanu spočívá po jeho aktivaci na SN-38 ve specifické blokádě topoisomeráz 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. Blokáde těchto enzymů vede k hromadění jedno- a dvouvláknových zlomů DNA hlavně během replikace, změnám v průběhu buněčného cyklu a případně v programovanou buněčnou smrt. (Hahn *et al.* 2006) Tento efekt je důležitý hlavně při eliminaci nádorových buněk, inhibitory topoisomerázy ale prokázaly účinek také v inhibici bakteriálního růstu. (Mathijssen *et al.* 2001)

### 1.6.4 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)

Aplikace irinotekanu probíhá nejčastěji nitrožilně, dávkování standardních chemoterapeutických režimů je závislé hlavně na tělesném povrchu a dosahuje 150-350 mg/m<sup>2</sup>. (Vanhoefer *et al.* 2001). V případě intraarteriálního podání nejčastěji ve snaze přímo ovlivnit metastázy kolorektálního karcinomu v játrech se může podávat i ve vyšších dávkách. (Vyzula 2017)

Nežádoucí účinky podání irinotekanu mohou zahrnovat průjem (zapojení bakteriální  $\beta$ -glukuronidázy do opětovné aktivace na SN-38), myelodysplastický syndrom a neutropenii, což může vést k vážnému ohrožení další plánované léčby a samozřejmě i celkového zdravotního stavu pacienta.

Tyto nežádoucí účinky jsou též důsledkem nedostatečného metabolismu aktivní formy irinotekanu SN-38 zejména glukuronidací, který může být způsoben i mnoha různými genetickými variantami enzymu UGT1, zodpovědného právě za tento proces. Genetická variabilita v souvislosti s toxicitou irinotekanu byla prokázána i u dalších enzymů, např. u

CYP3A, enzymu z rodiny cytochromu P450.(Paulik *et al.* 2012)

S rozvojem molekulárně biologických technologií byl Americkou agenturou pro léčivé prostředky (FDA) schválen genetický test polymorfismu genu pro enzym CYP3A4. Tento test by měl individualizovat dávkování irinotekanu a částečně tak snížit výskyt nežádoucích účinků i toxických projevů. Jeho hodnota a přínos jsou však nadále sporné.(Dean 2012; Hahn *et al.* 2006) Z podobných důvodů, tedy snížení nežádoucí toxicity a zvýšení dostupnosti v nádorových buňkách, se také pracuje na vývoji jiných lékových forem tohoto zajímavého cytostatika, hlavně pak na lipozomálním irinotekanu nebo mikrozmálních sférách obsahujících irinotekan. (Kalra *et al.* 2014)

I když je irinotekan relativně dlouhodobě klinicky využíván jako cytostatikum, jeho účinky na cílové nádorové buňky, a to zejména buňky CRC, nejsou stále na mechanistické úrovni dostatečně prozkoumány. Výzkum vybraných aspektů těchto účinků v modelu CRC *in vitro* byl i cílem této práce.



## Část 2.

## 2.1 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.

## 2.2. Metodika

### 2.2.1 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 mikroklků, 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 vyřazenými 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.

Lidské stabilizované linie kolorektálního karcinomu SW-620 (číslo 87051203) a HCT-116 (číslo 91091005) byly získány z evropské buněčné banky ECACC (Porton Down, Velká Británie). Upravená linie HCT-116-P53KO byla získána z pracoviště profesora B. Vogelsteina (University of Pennsylvania, Baltimore, Maryland, Spojené Státy Americké).

Normální střevní fibroblasty NCF-CCD-18 byly získány z buněčné banky ATCC (CRL 1459, Rockville, Maryland, Spojené Státy Americké). Tyto linie byly pěstovány v Eaglově modifikovaném mediu dle Dulbecca (DMEM) s 10 % fetálním bovinním sérem, penicilinem 100U/ml a streptomycinem 100 $\mu$ g/ml 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.

Buňky normálních lidských kolonocytů NCM byly získány z Incell Corporation, LCC (NCM-460, San Antonio, Texas, Spojené Státy Americké) a byly pěstovány v médium M3Base<sup>TM</sup> s přídatkem penicilinu 100 IU/ml, streptomycinu 100  $\mu$ g/ml a 10% teplem aktivovaného fetálního bovinního séra. Kultury byly udržovány v inkubátoru při stabilní teplotě 37 °C ve vlhčené atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub> a 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.

### 2.2.2 Nasazování do testů a ovlivnění

Buňky jednotlivých linií byly nasazovány v rámci jednotlivých testů do různých kultivačních nádob – klasické kultivační lahve (malé či střední), cytomůrky, podložní sklíčka, 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 konfluence 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.

Inhibitory apoptózy byly připraveny ze zásobního roztoku rozpuštěním v příslušném kultivačním médiu do výsledných koncentrací: 10  $\mu$ M z-VDVAD-fmk (inhibitor kaspázy 2), 10  $\mu$ M z-LEHD-fmk (inhibitor kaspázy 9), z-DEVD-fmk (inhibitor kaspázy 3); ovlivnění proběhlo vždy současně s podáním CPT-11.

Inhibitory autofagie byly rozpuštěny buď v DMSO nebo v bezsérovém médiu a použity jako zásobní roztok k ředění do výsledných koncentrací v kultivačním médiu: inhibitor autofagie 3-MA (5mM, buňky ovlivněny 30 minut před podáním irinotekanu), inhibitor autofagie chloroquin (5mM, buňky ovlivněny 30 minut před podáním irinotekanu). Kontrolní kultury byly ovlivněny inhibitory samotnými případně adekvátním množstvím použitého rozpouštědla.

### 2.2.3 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-Bec1-1, monoklonální myší anti-p62, monoklonální myší anti-TP53, monoklonální králičí anti-COX-IV a monoklonální myší anti-beta aktin, monoklonální králičí anti-phospho-p53, monoklonální myší 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-iodophenyl)-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.

## 2.2.4 Metodika testů

### 2.2.4.1 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.

### 2.2.4.2 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)).

### 2.2.4.3 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 jejích 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).

### 2.2.4.4 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® 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).

#### 2.2.4.5 Adheze buněk

Adhesivní vlastnosti buněk směrem k extracelulární matrix byly měřeny kitem Vybrant™ 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  $\mu$ l roztoku calcein AM (finální koncentrace 5  $\mu$ M). Následovala inkubace 30 minut při 37 °C, proplach předeřtým kultivačním médiem a opětovná resuspendace. 100  $\mu$ l 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.

#### 2.2.4.6 Metylce 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.



#### 2.2.4.7 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 (Vosskuhler, 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.

#### 2.2.4.8 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.

#### 2.2.4.9 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 spektrofluorimetricky (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.

#### 2.2.4.10 Test buněčné signalizace

Pro stanovení úrovně konkrétní buněčné signalizace po poškození DNA u buněk vystavených irinotekanu byl využit komerční kit PathScan<sup>®</sup> 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 spektrofluorimetricky (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.

#### 2.2.4.11 Exprese 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 1:100, 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.

#### 2.2.4.12 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.

#### 2.2.4.13 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 transientní transfekci většiny savčích buněk. Následně bylo 3 x 10<sup>6</sup> buněk vybraných linií rozpuštěno v 1 ml média DMEM s 10 % FBS a smíšeno s 20 µg 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 β-galaktosidázy průtokovou cytometrií 24h po transfekci a typicky dosahovala 50-60 %.

#### 2.2.4.14 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.

#### 2.2.4.15 Test permeabilizace lysozomálních membrán

Kontrolní a irinotekanu-vystavené buňky kultivované na 96jamkových destičkách byly barveny 5µM 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 oranži 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 5µM

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, Vosskühler, Spolková republika Německo) byly analyzovány za pomoci programu NIS Elements AR 3.20 a minimálně 1.000 buněk bylo použito k morfometrické analýze.

#### 2.2.4.16 Detekce autofagie

##### 2.2.4.16.1 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 spektrofluorimetry (390/455 nm, TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grödig, Rakousko)). Výsledky byly znázorněny jako relativní nárůst MDC-specifické fluorescence oproti neovlivněné kontrole.

##### 2.2.4.16.2 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'-GAAGATGTCCGACTTATTCGAGAG-3', (reverse) 5'-ACTCTCATACACCTCTGAGATTGG-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 β-aktin (forward) 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3', (reverse) 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGACAG-3'. Expres ampikonu byla srovnávána s mRNA β-aktinu. Ze získaných dat byl spočítán rozdíl exprese mezi jednotlivými zmíněnými geny.

#### 2.2.4.17 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.

#### 2.2.4.18 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 přidávkem digitoninu.

Lysozomální 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 lysozomy byl resuspendován v extrakčním pufru a opět centrifugován (20.000 G, 60 minut).

Buněčné lyzáty a lysozomální frakce byly vařeny po 5 minut při 95 °C v SDS vzorkovacím pufru (Tris-HCl pH 6,81, 2-merkaptoetanol, 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 pětkrát 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).

#### 2.2.4.19 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.

#### 2.2.4.20 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  $\mu$ l užitím 1  $\mu$ l 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 jadérová 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.

### 2.2.5 Statistická analýza

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 porovnáání *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.



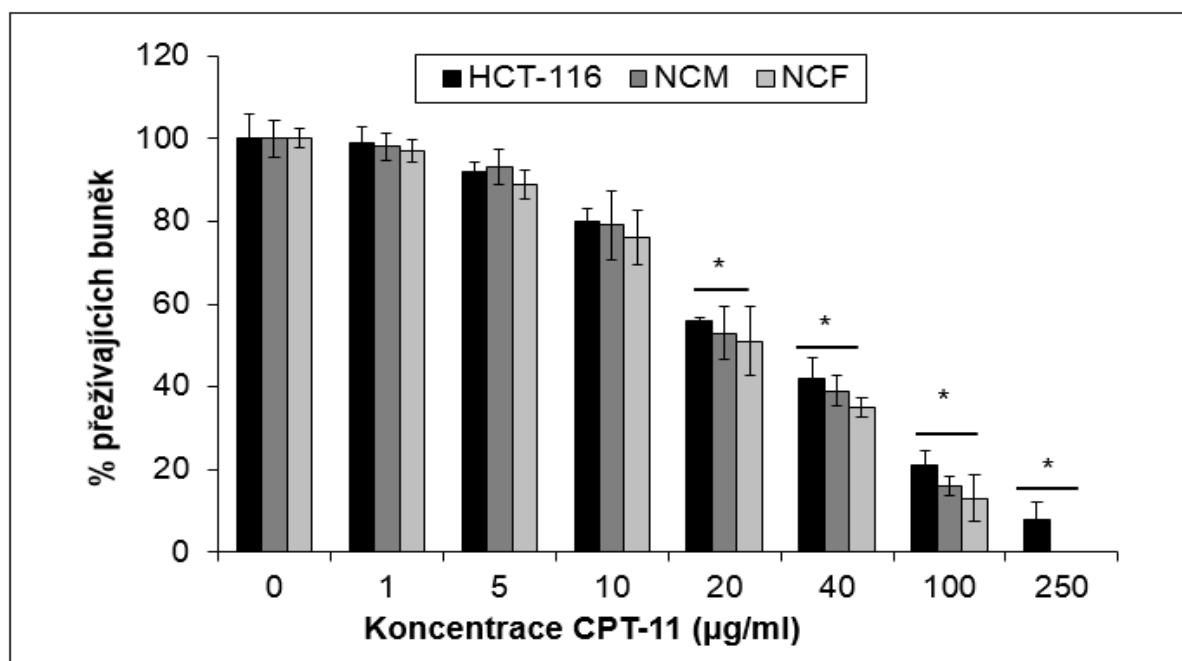
### Část 3.

### 3.1 Výsledky

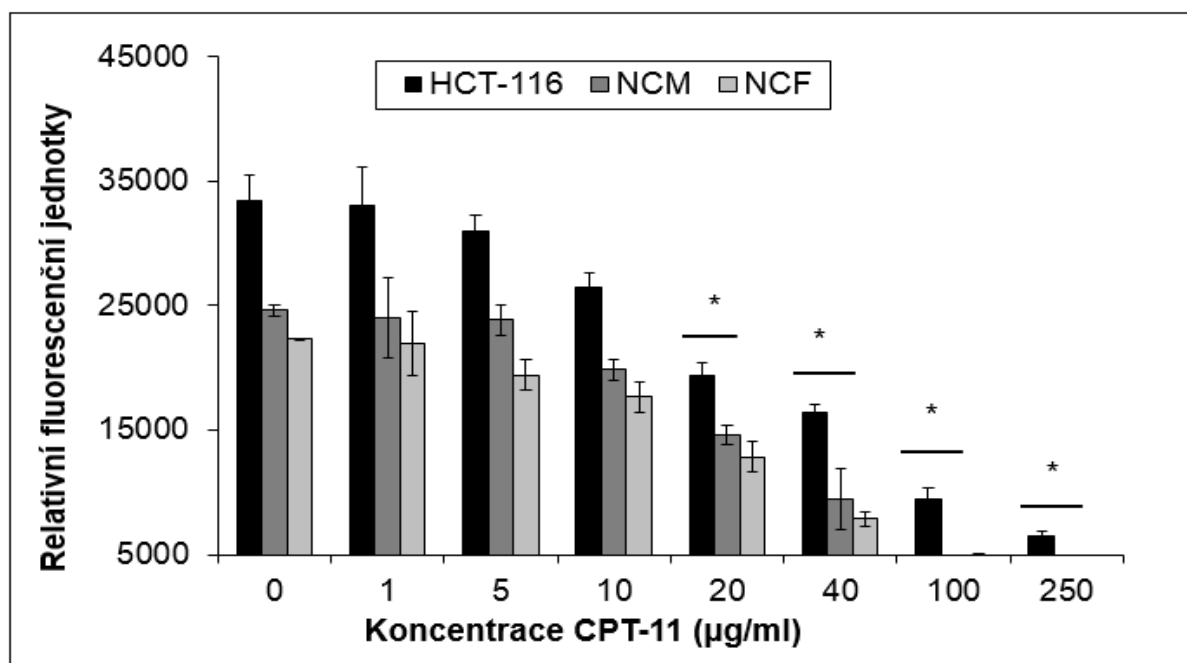
#### 3.1.1. Vliv CPT-11 na růstové parametry nádorových i nenádorových střevních buněk

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  $\mu\text{g/ml}$ , i když již pro koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  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).

A



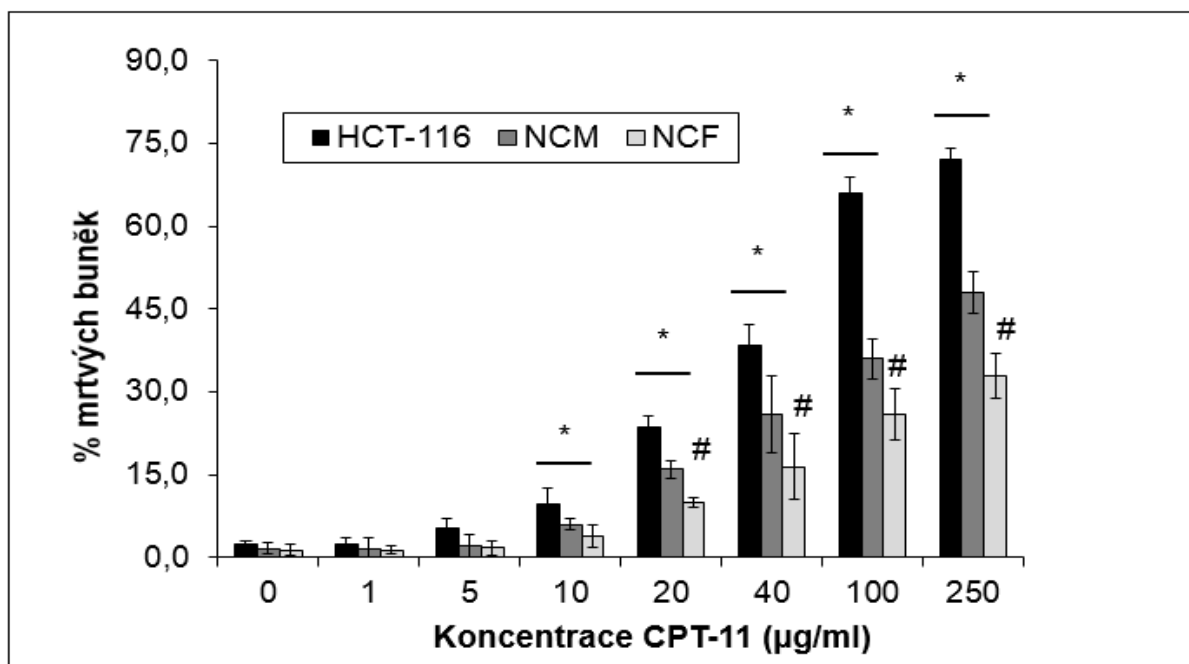
B



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 kontrolními buňkami ve stejném časovém intervalu

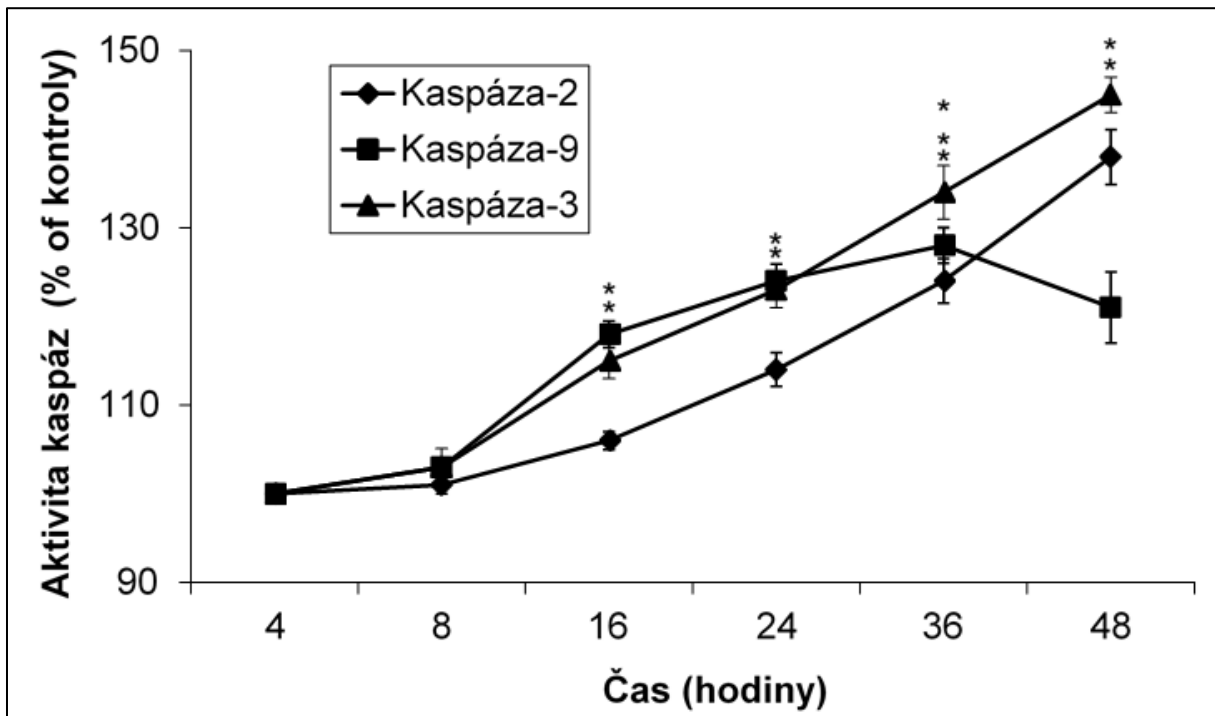
### 3.1.2. Vliv CPT-11 na buněčnou smrt/senescenci

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  $\mu\text{g/ml}$  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  $\beta$ -galaktosidázy, markeru senescence. Jak je ukázáno na Obr. 9, pozitivita na  $\beta$ -galaktosidázu se u všech linií zvyšovala již od ovlivnění CPT-11 v koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ , a to nejvíce u linie NCF, přičemž maxima bylo dosaženo při koncentraci 40  $\mu\text{g/ml}$ , 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  $\mu\text{g/ml}$  CPT-11 (Obr. 10), a zvýšením buněčné adhezivity u téže linie, významné nicméně až při vyšších CPT-11 koncentracích (Obr. 11).

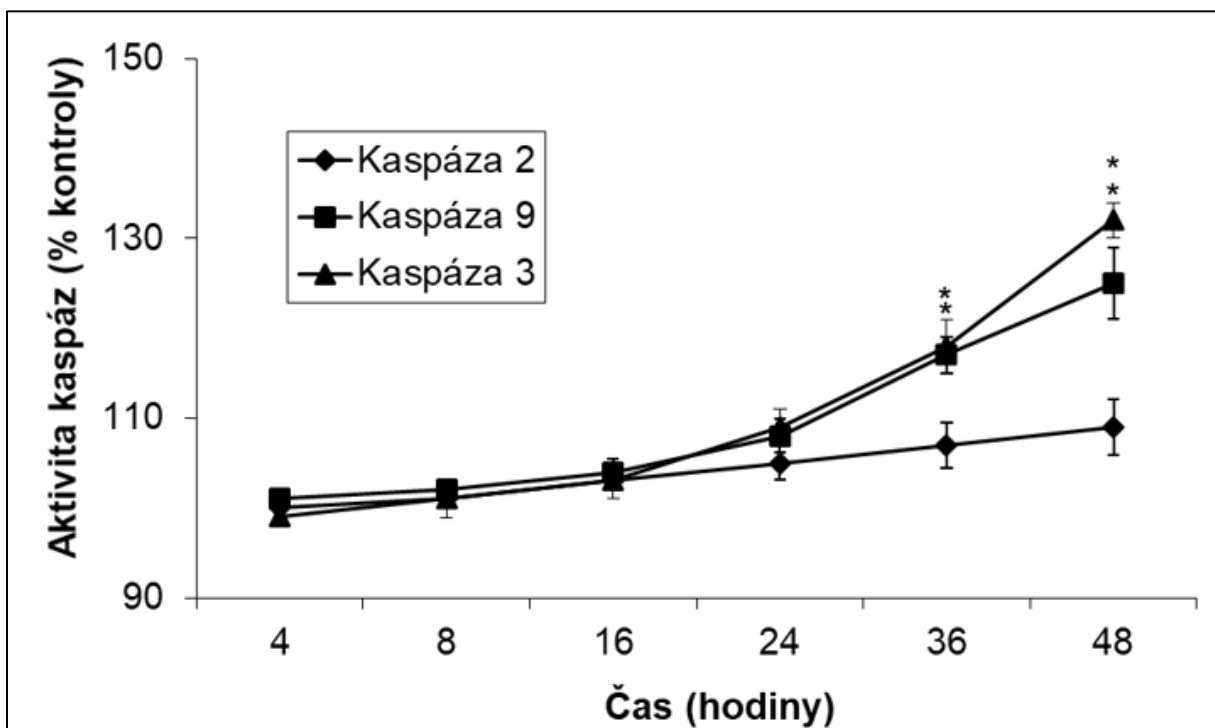


Obr.7: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-250 µg/ml na buněčnou smrt linie kolorektálního karcinomu HCT-116 a nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami ve stejném časovém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

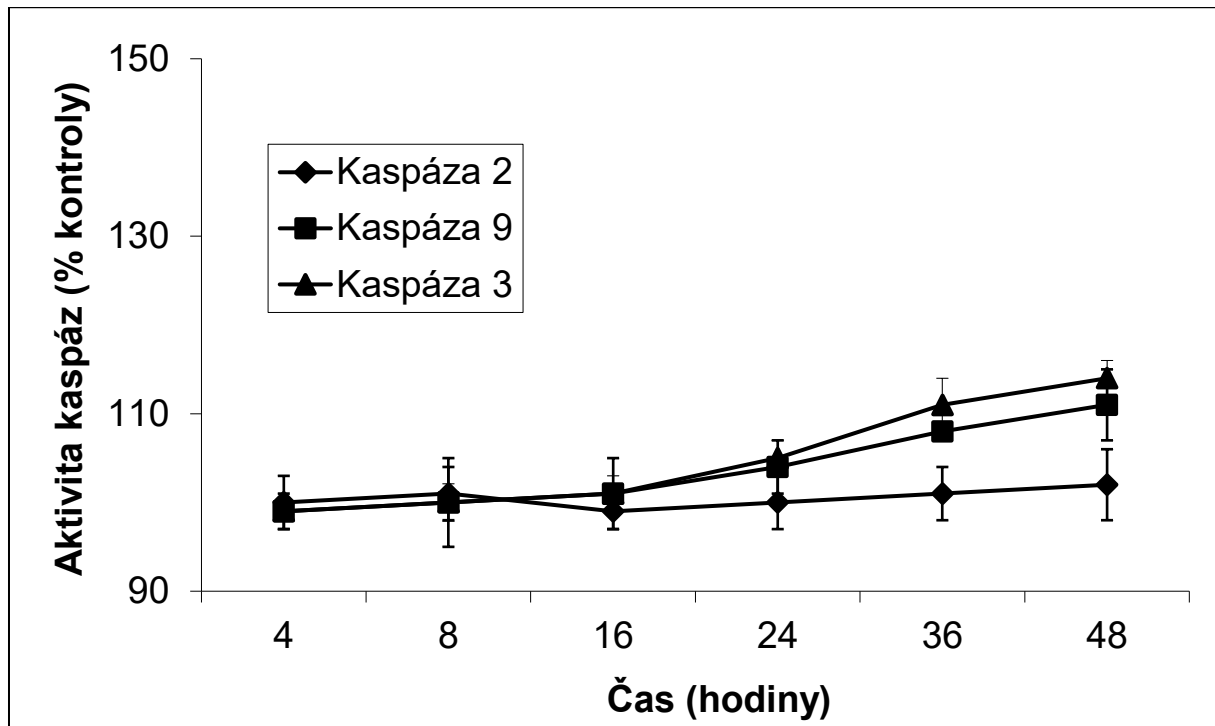
A



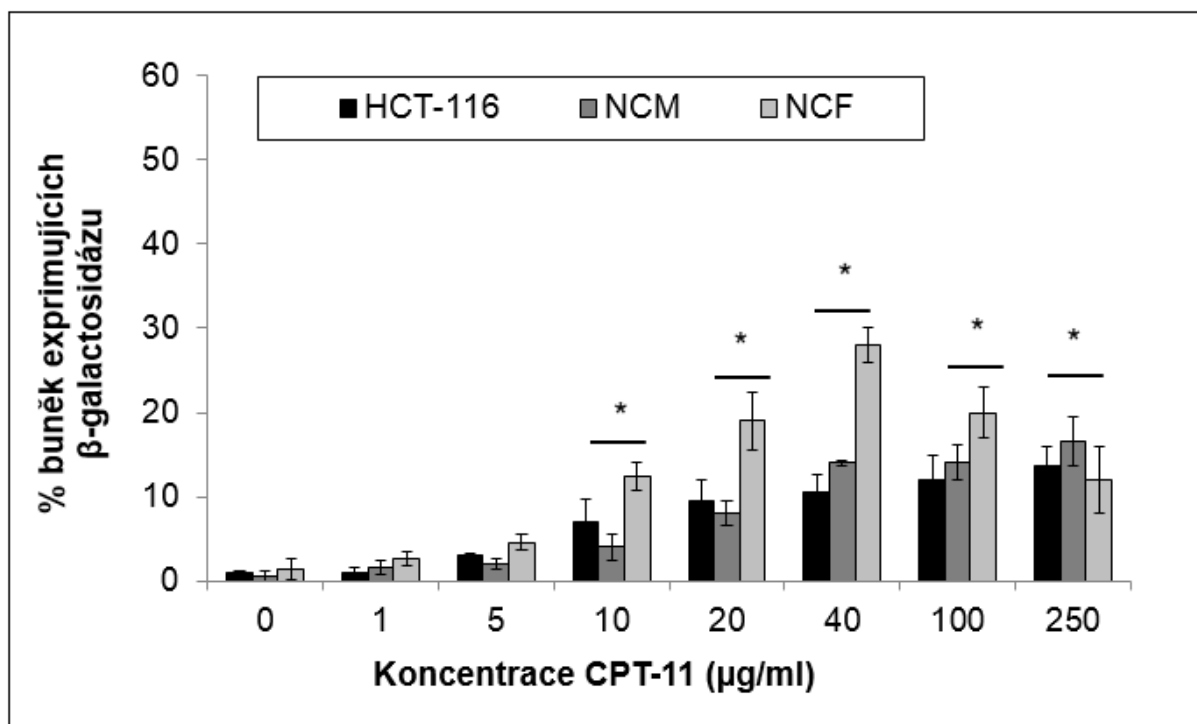
B



C

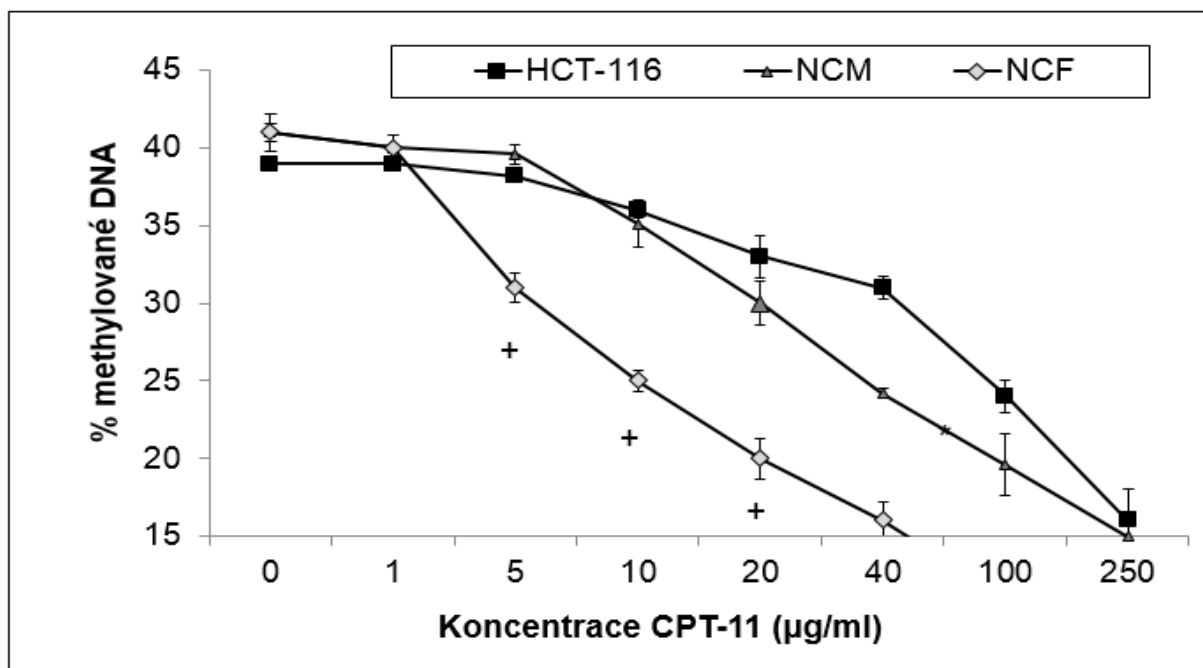


Obr. 8: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  na aktivitu kaspázy-2, -9 a -3 u buněk linie kolorektálního karcinomu HCT-116 (A) a nenádorových linií NCM (epitelová) (B) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) (C) v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem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

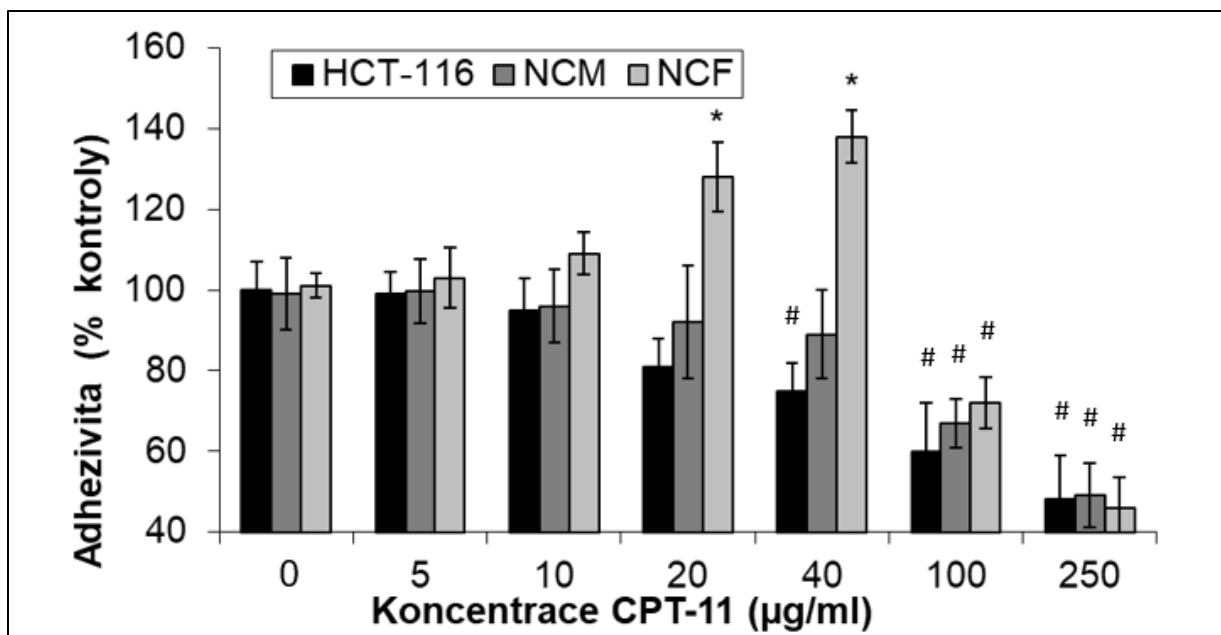


Obr. 9: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-250 µg/ml na expresi β-galaktosidázy u buněk linie kolorektálního karcinomu HCT-116 a nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) v časovém intervalu 48 hodin. \*P < 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami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

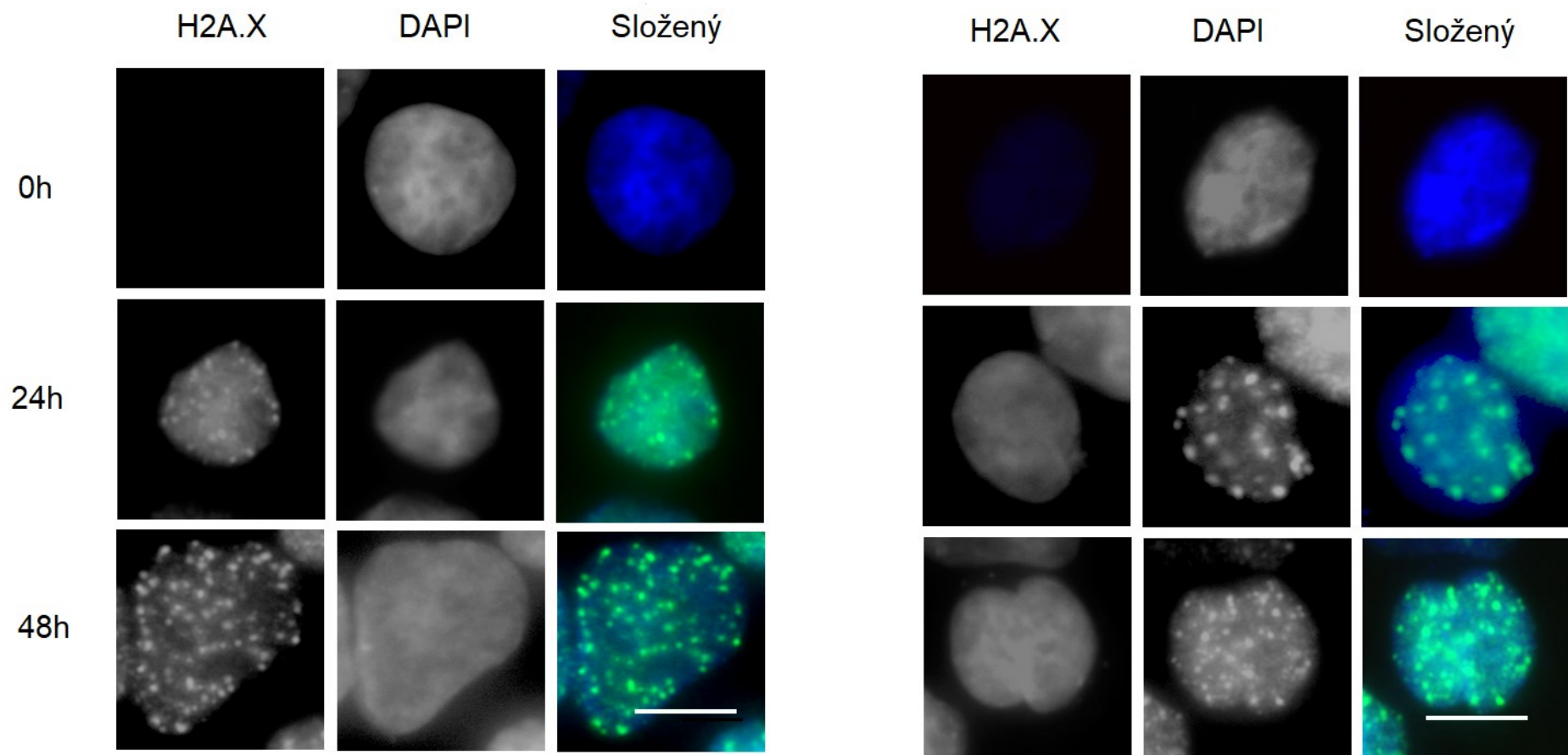


Obr. 11: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-250 µg/ml na změnu adhezivitu buněk linie kolorektálního karcinomu HCT-116 a nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 nárůst v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami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

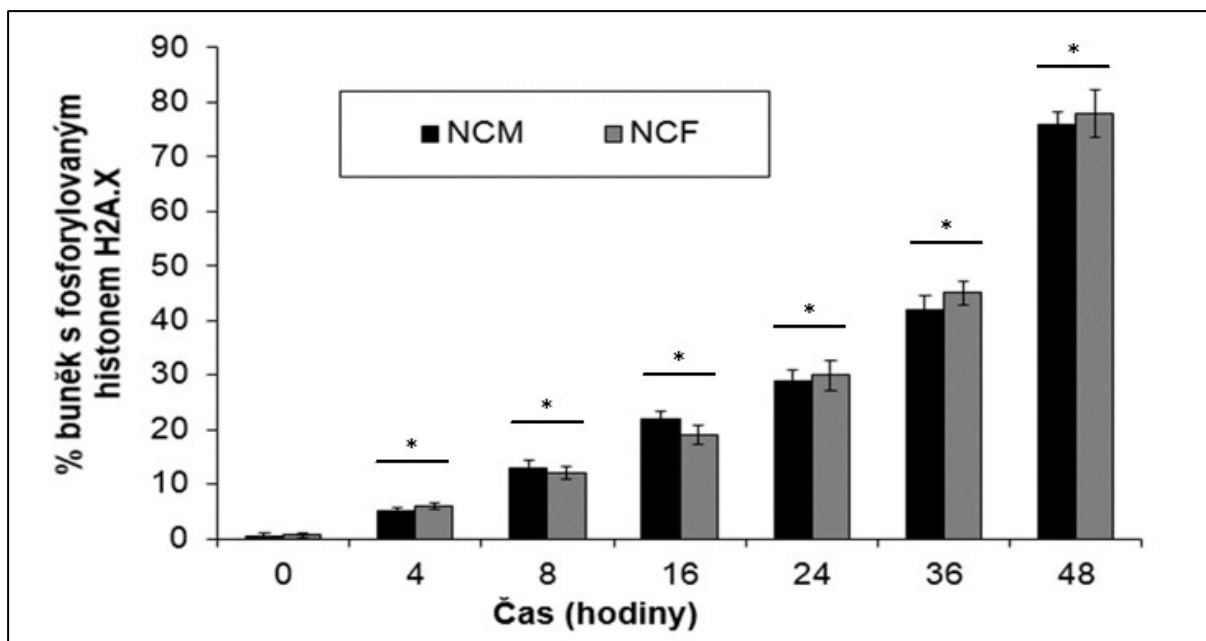
### 3.1.3 Vliv CPT-11 na poškození DNA a specifickou signalizaci

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 jevíly 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 µg/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).

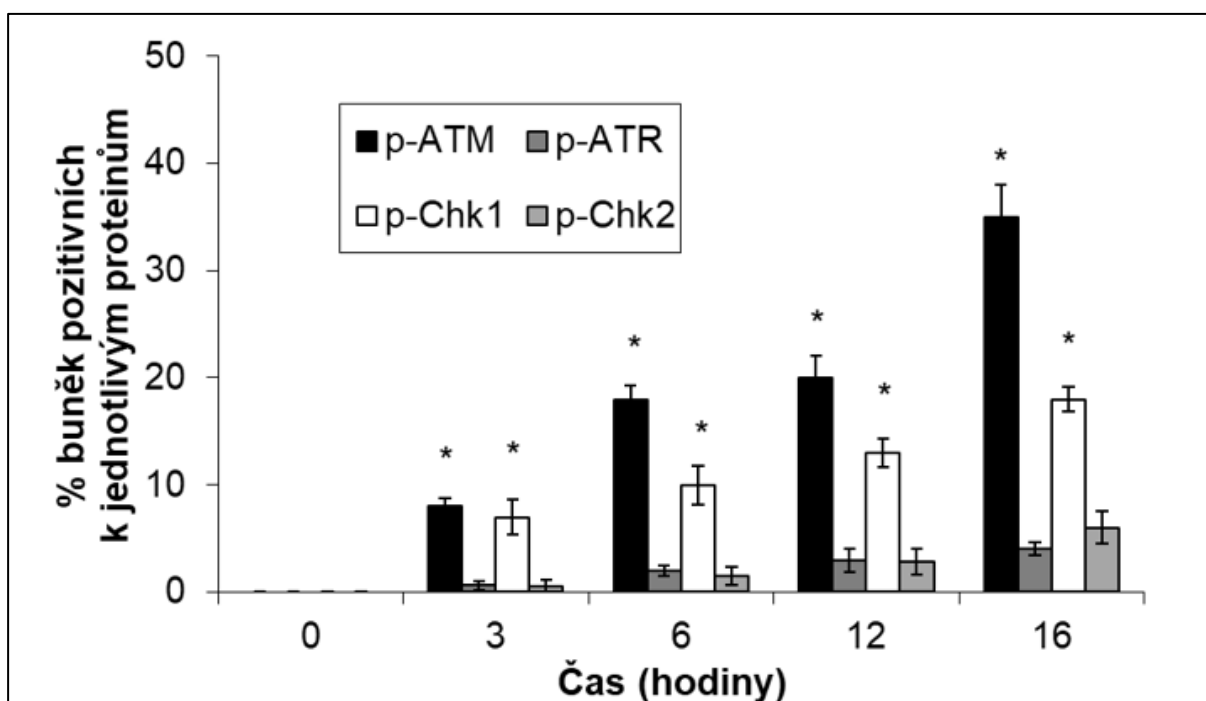
V obou liniích byla dále zaznamenána přítomnost aktivované MAPK kinázy p38, která se uplatňuje při stresové odpovědi buňky na různé stimuly včetně poškození DNA. U NCM buněk došlo po ovlivnění CPT-11 k brzké aktivaci této kinázy (4 hodiny), přičemž jejího maxima bylo dosaženo po 12 hodinách od ovlivnění, 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  $\mu\text{m}$ .

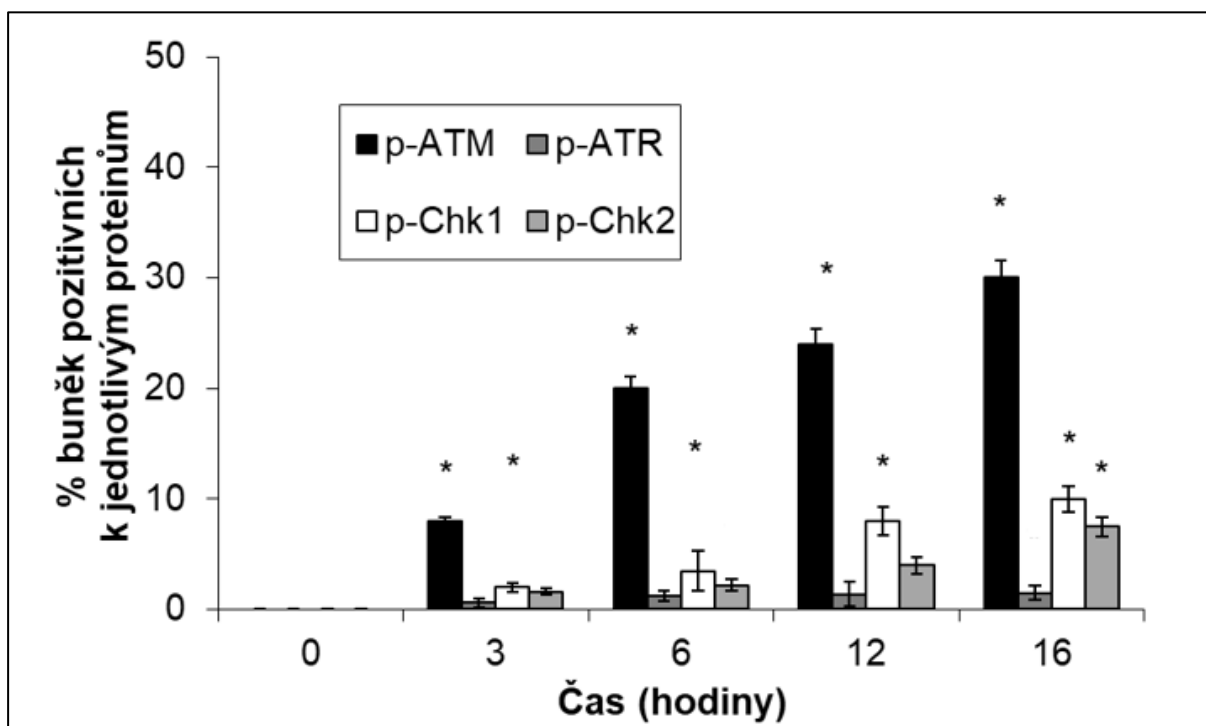


Obr. 13: Počty buněk s jádrem pozitivním na H2A.X ložiska u nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) ovlivněných 20 µg/ml irinotekanu (CPT-11) v časovém intervalu 48 hodin. \*P < 0,05 v porovnání s počátkem ovlivnění.

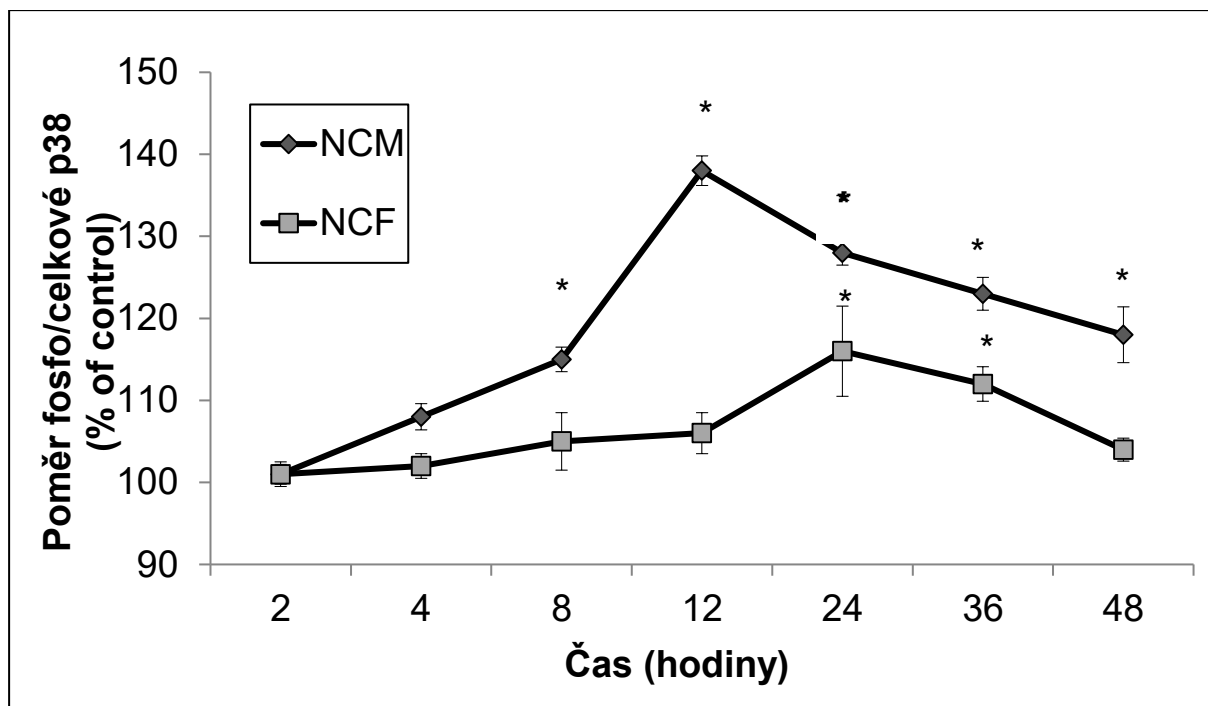


Obr. 14: Časový průběh aktivace kináz ATM, ATR, Chk1 a Chk2 po ovlivnění nenádorové linie NCM (epitelová) irinotekaniem (CPT-11) v dávce 20 µg/ml v průběhu 16 hodin.

\*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.

#### 3.1.4. Vliv CPT-11 na expresi proteinů TP53 a p16

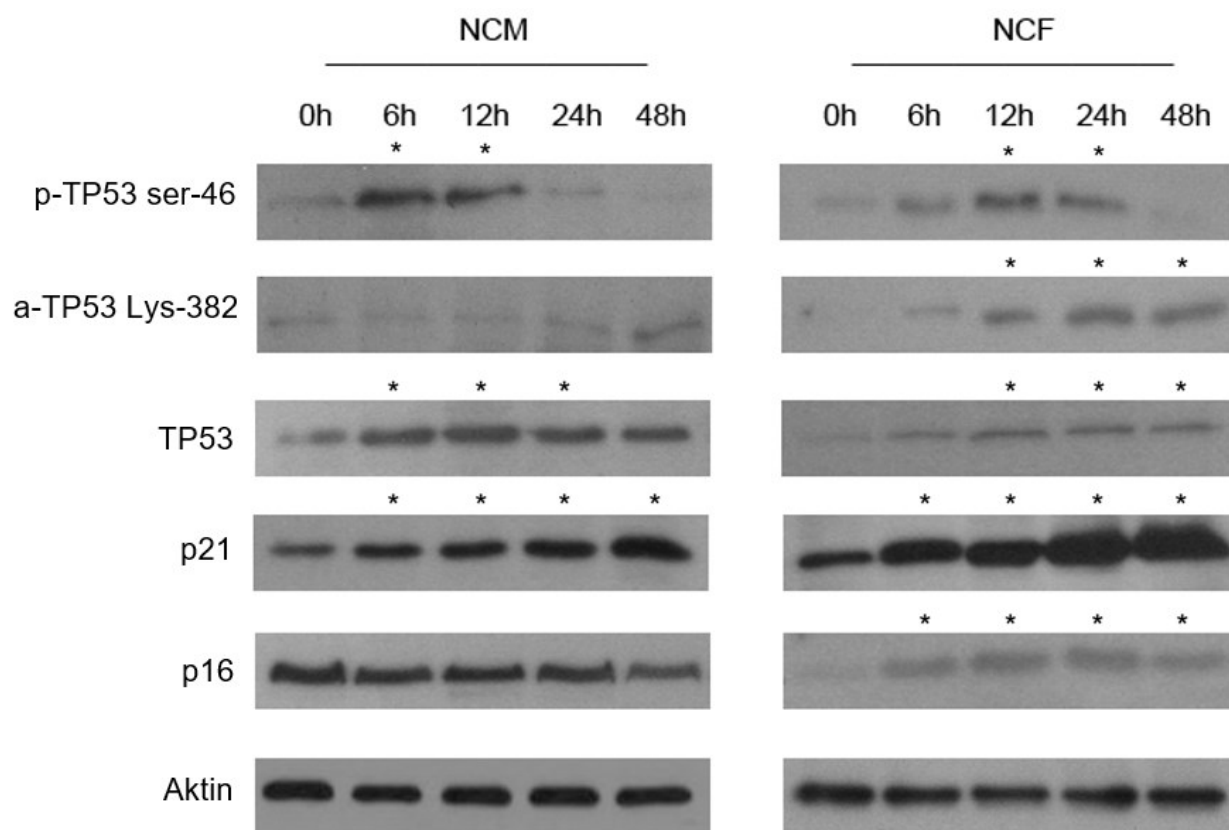
CPT-11 vyvolal u obou testovaných nenádorových linií poškození DNA, které aktivovalo specifickou nitrobuněčnou signalizaci vedoucí k odlišným projevům ve smyslu apoptózy a senescence. Z tohoto důvodu se cílem dalšího výzkumu se stala aktivita a exprese klíčových mediátorů těchto procesů, tj. proteinů 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.

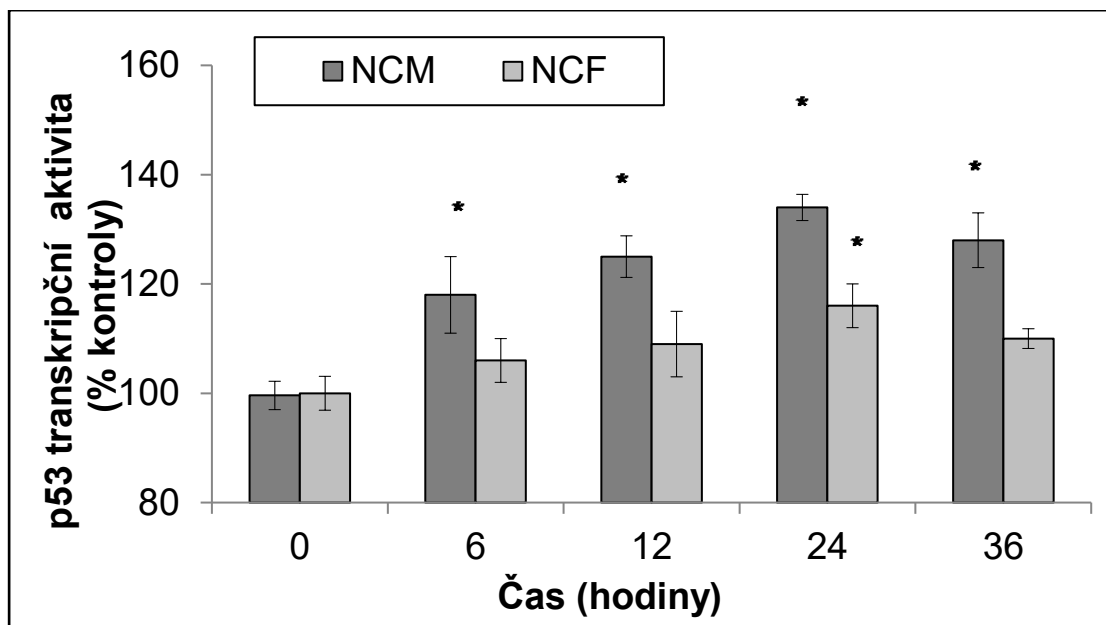
U linie NCF vyvolal CPT-11 opět zvýšení exprese TP53, avšak méně výrazně ve srovnání s buňkami NCM. Fosforylace TP53 na pozici Ser-46 se také zvyšovala, nicméně významného nárůstu dosáhla (spolu s acetylací na pozici Lys-382) až 12 hodin po ovlivnění. CPT-11 vyvolal trvalý nárůst exprese proteinu p16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





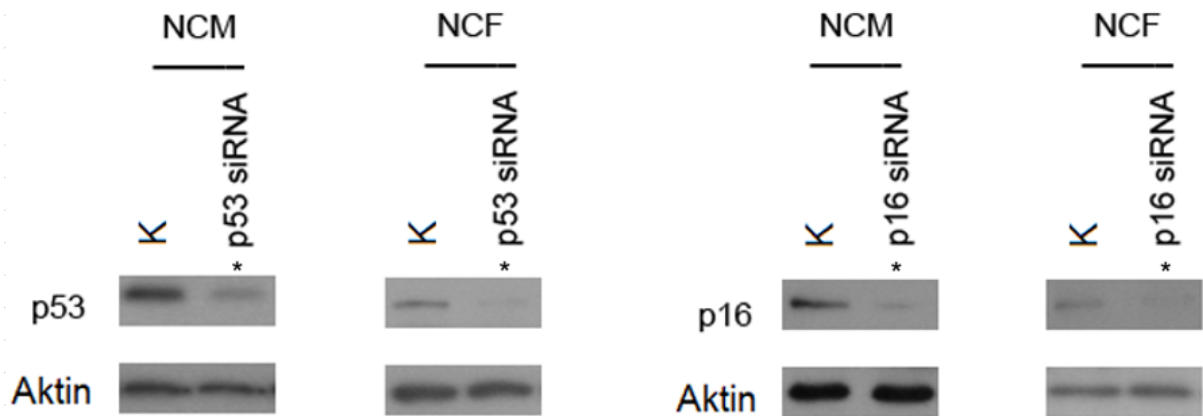
Obr. 17: Časový průběh exprese vybraných proteinů účastnících se intracelulární stresové signalizace u nenádorových buněk linie NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) ovlivněných irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml během 48 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty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



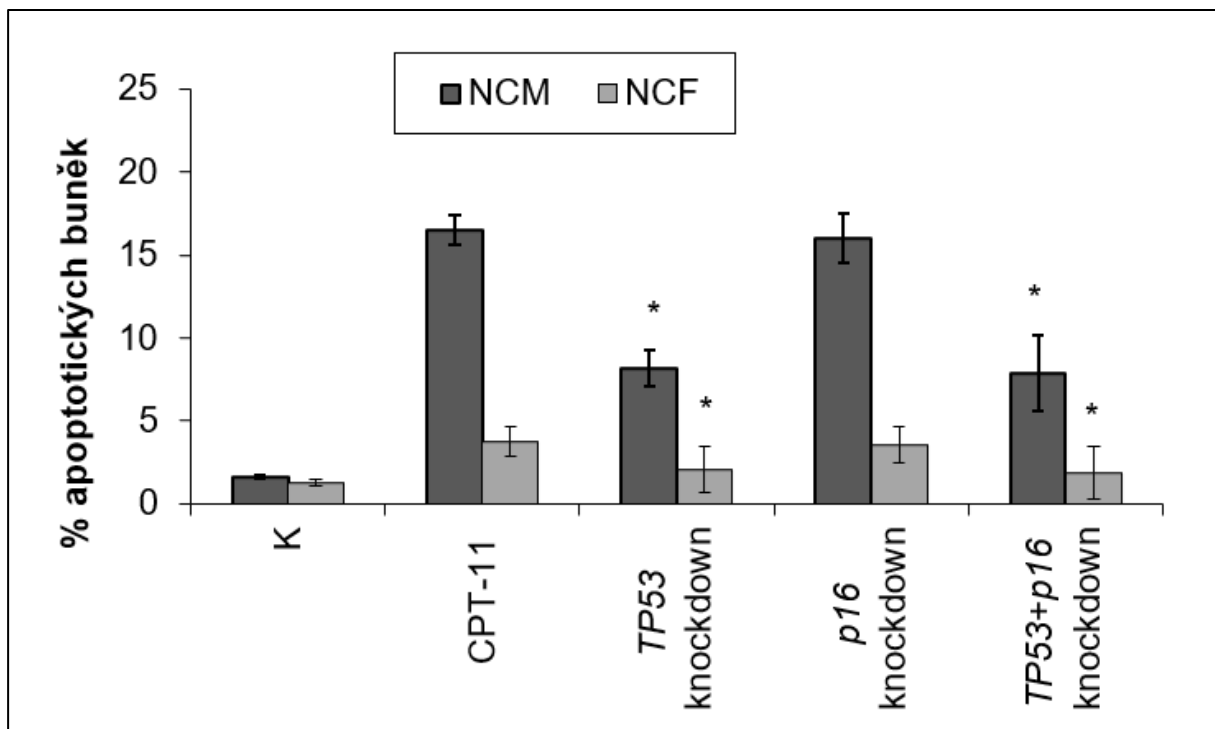
Obr. 18: Časový průběh změn v transkripční aktivitě TP53 u nenádorových linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) ovlivněných irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml během 36 hodin. \*P < 0,05 v porovnání s počátkem ovlivnění.

### 3.1.5. Úloha proteinů TP53 a p16 na CPT-11 vyvolanou apoptózu a senescenci

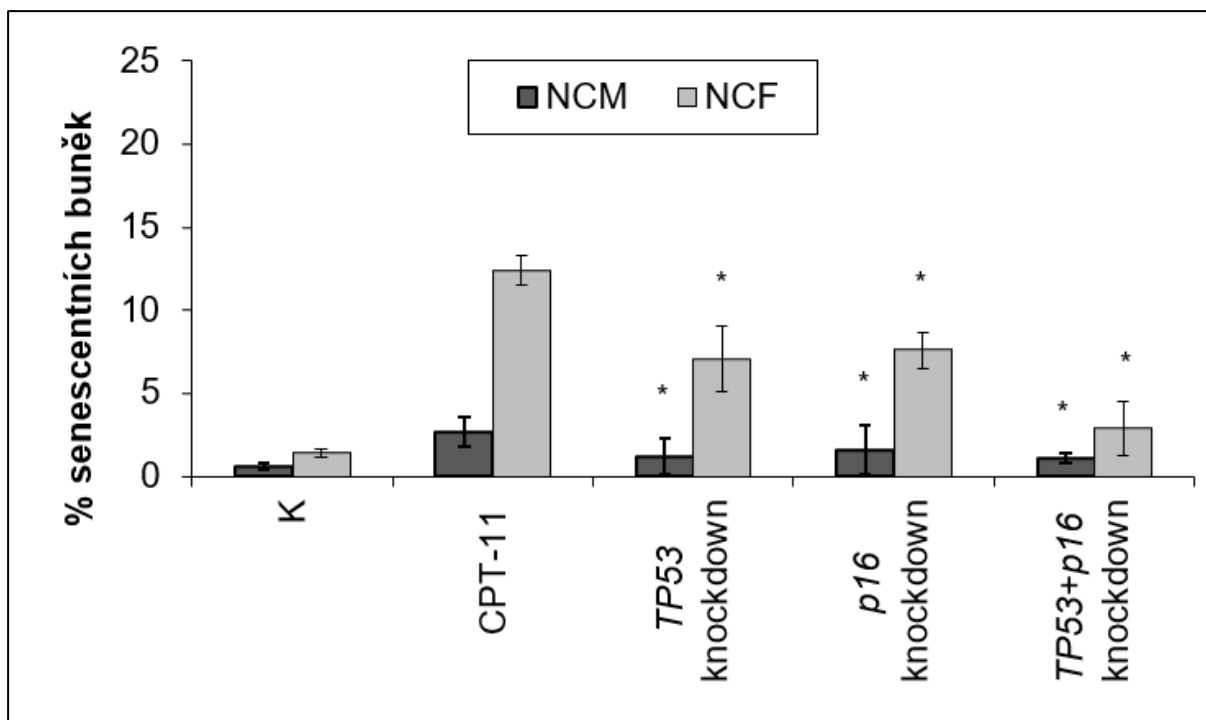
Pro mechanistické ověření úlohy a významu proteinů TP53 a p16 v CPT-11 navozené intracelulární stresové signalizaci a následné apoptóze/senescenci byla exprese příslušných genů umlčena metodou RNA interference (siRNA-genový knockdown). V úvodu jsme nejprve ověřili účinnost umlčení obou genů pomocí imunoblotingu. 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.

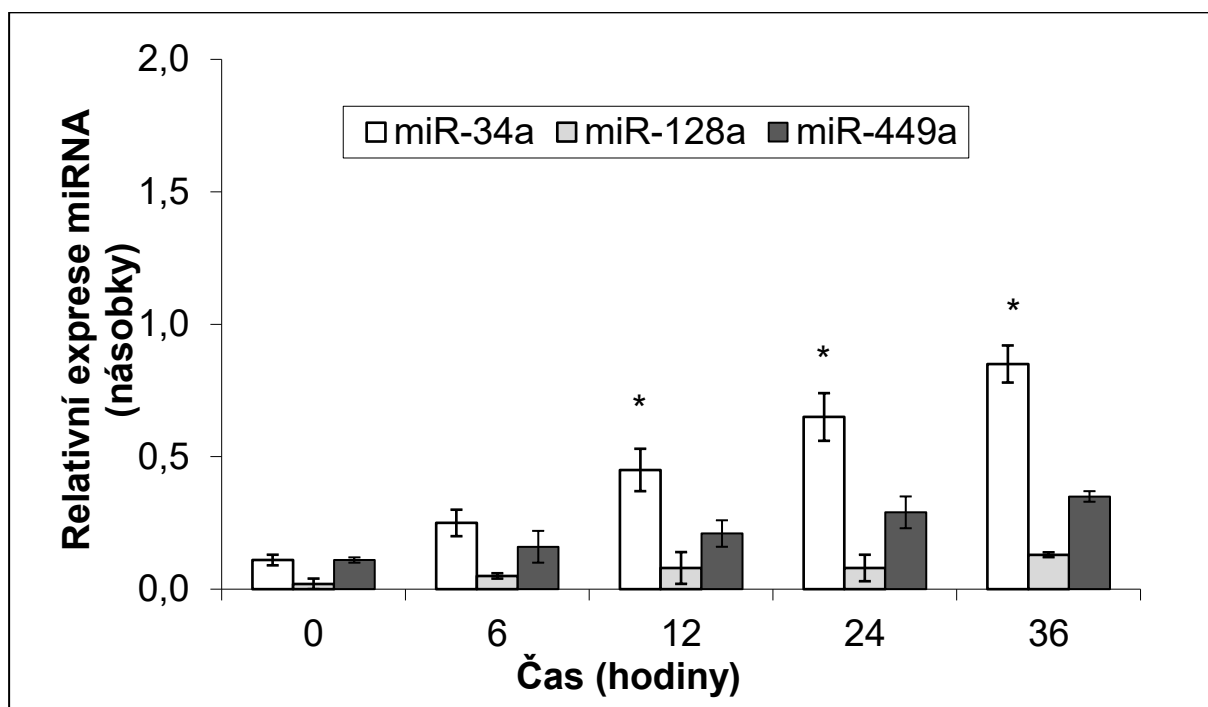


Obr. 21: Efekt umlčení exprese (knockdown) genů *TP53* a/nebo *p16* pomocí siRNA u nenádorových buněčných linií NCM (epitelová) a NCF (mesenchymální – fibroblastová) na přítomnost senescence vyvolané irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  v intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání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

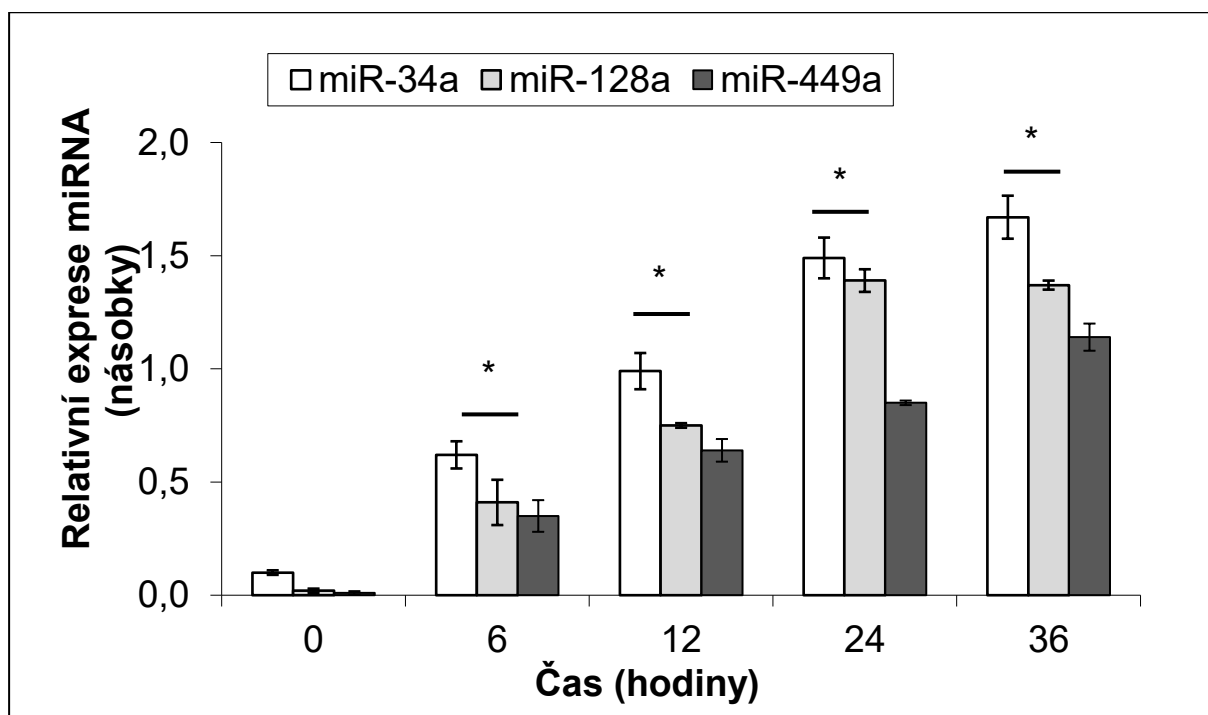
### 3.1.6. Exprese vybraných miRNA u buněk ovlivněných CPT-11

S ohledem na současný stav znalostí mechanismů zapojených do intracelulárních stresových signalizací jsme u NCM a NCF buněk vystavených CPT-11 v koncentraci 20 µg/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).

A



B

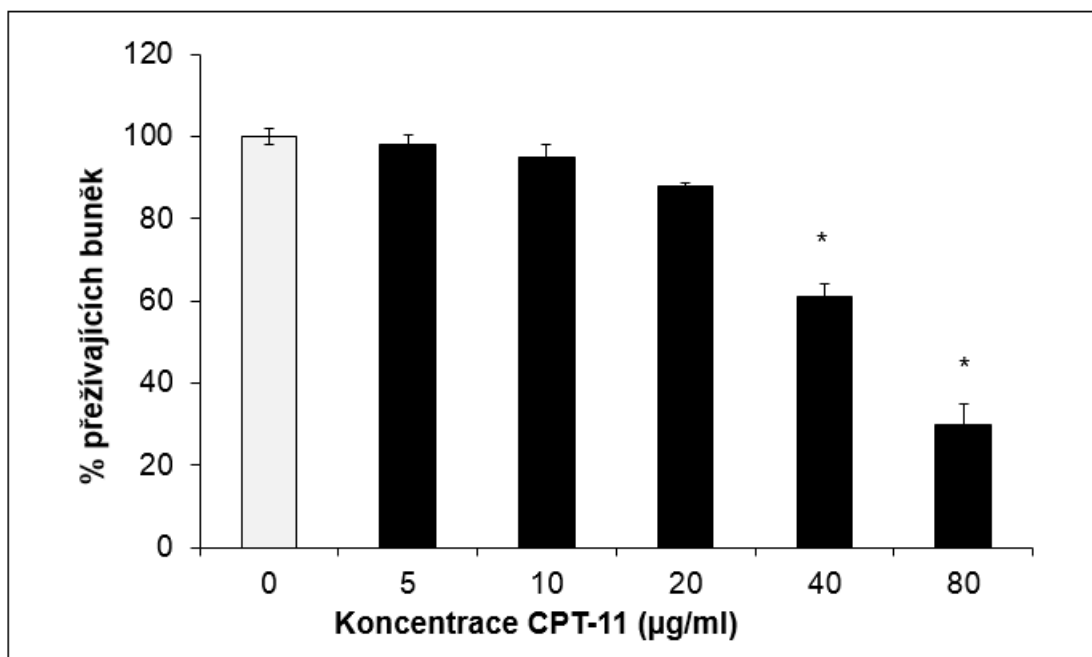


Obr. 22: Časový průběh vybraných miRNA zapojených do procesu senescence během 36 hodin ovlivnění irinitekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  u nenádorových buněčných linií (A) NCM (epitelová) a (B) NCF (mesenchymální – fibroblastová). \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění CPT-11

### 3.2.1 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 µg/ml (Obr. 23). Tato koncentrace byla tedy zvolena jako výchozí pro další testování.

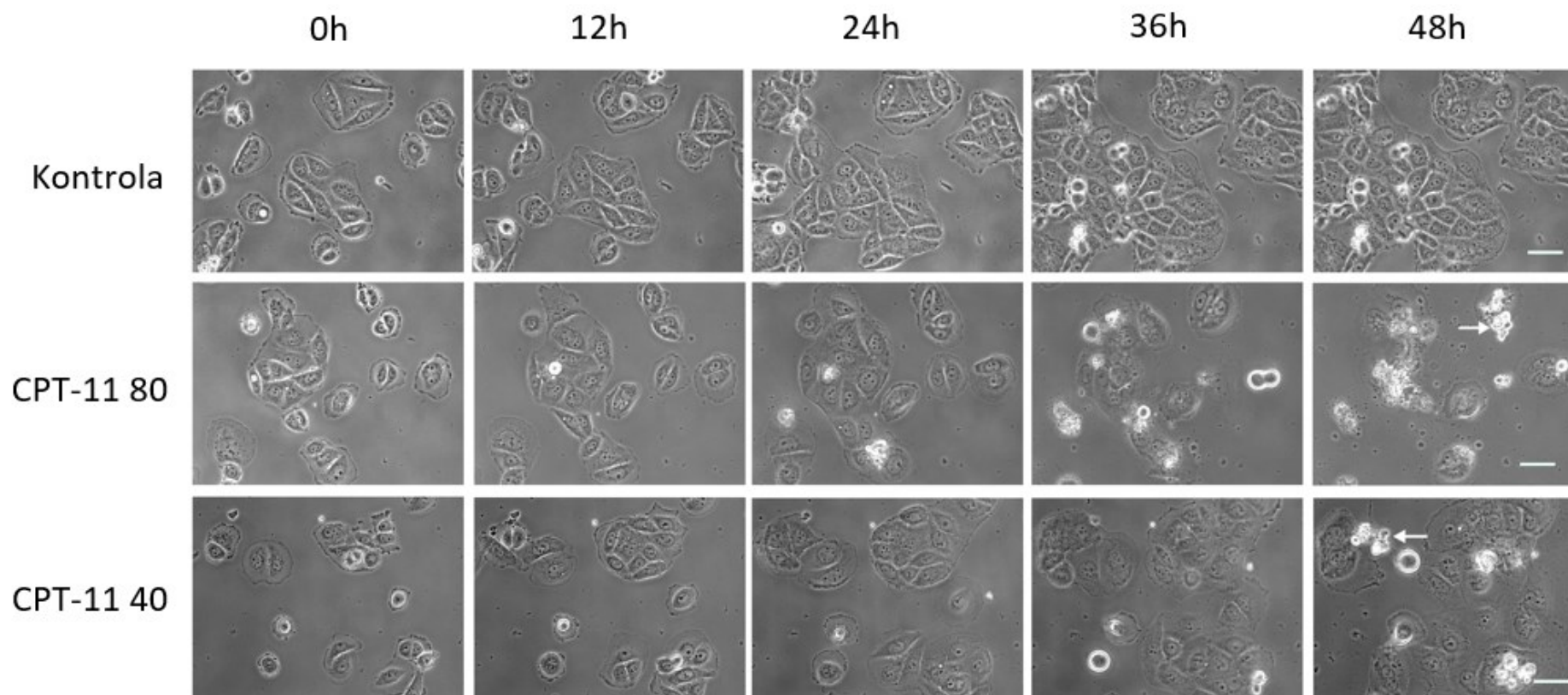




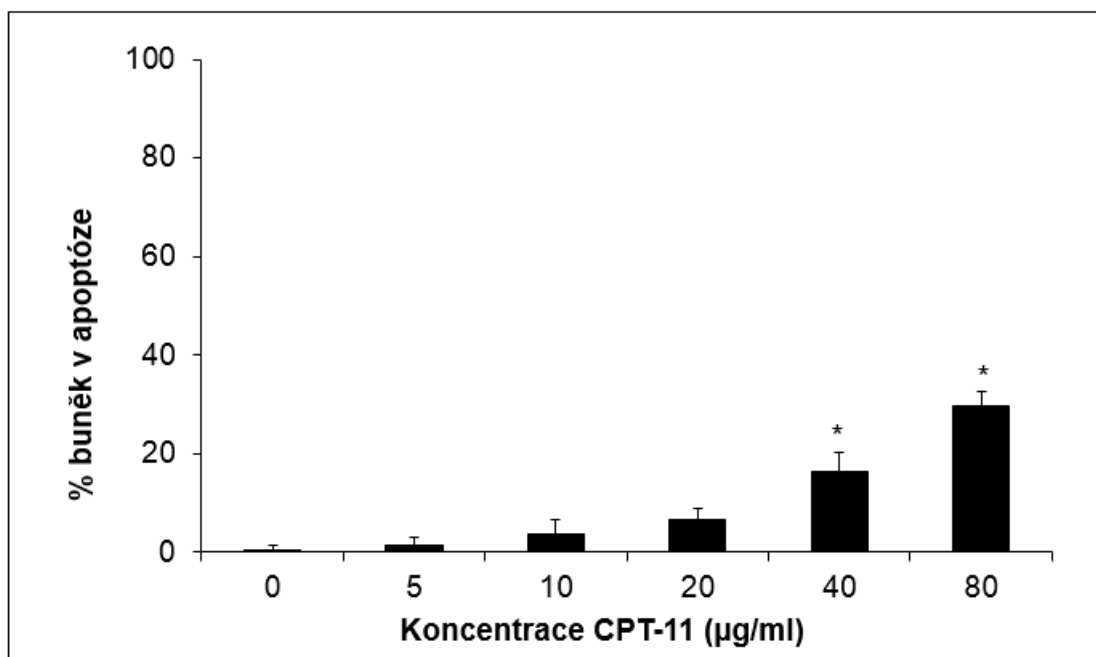
Obr. 23: Proliferace a viabilita linie kolorektálního karcinomu SW-620 v koncentračním rozmezí 0-80 µg/ml a v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s neovlivněnými kontrolní buňkami ve stejném časovém intervalu.

### 3.2.2 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  $\mu\text{g/ml}$  a v časovém intervalu 48 hodin. Fázově kontrastní mikroskopie. Zvětšení 600x. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

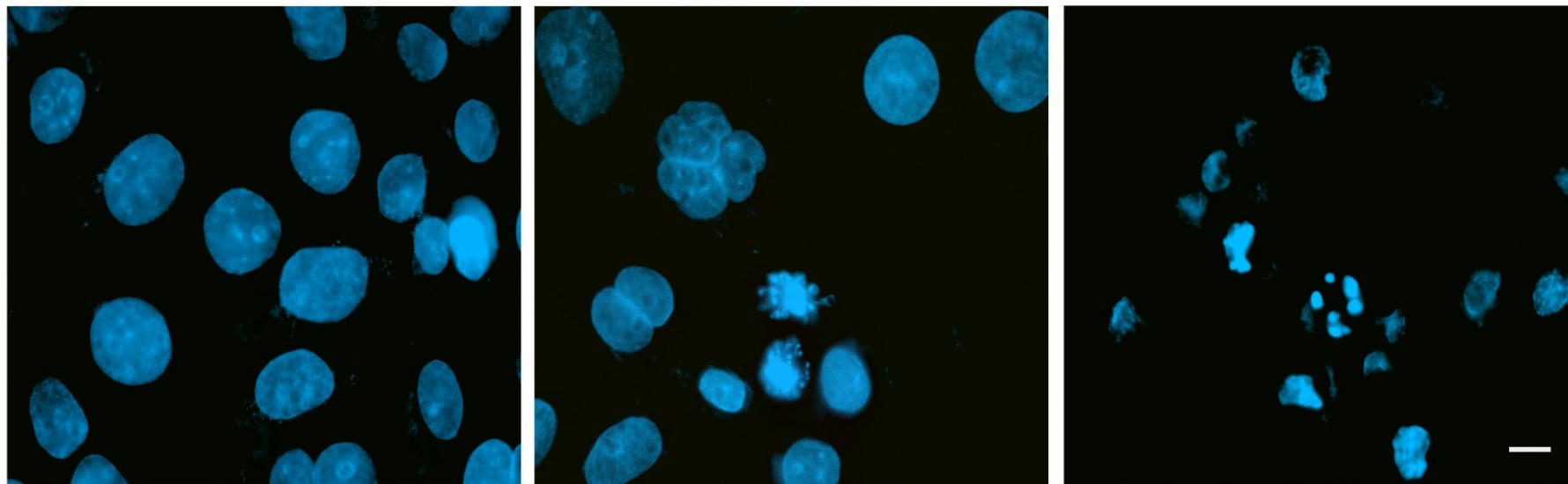


Obr. 25: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-80 µg/ml a v časovém intervalu 48 hodin na apoptózu u buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620. \* $P < 0,05$  v porovnání s neovlivněnými kontrolní buňkami ve stejném časovém intervalu.

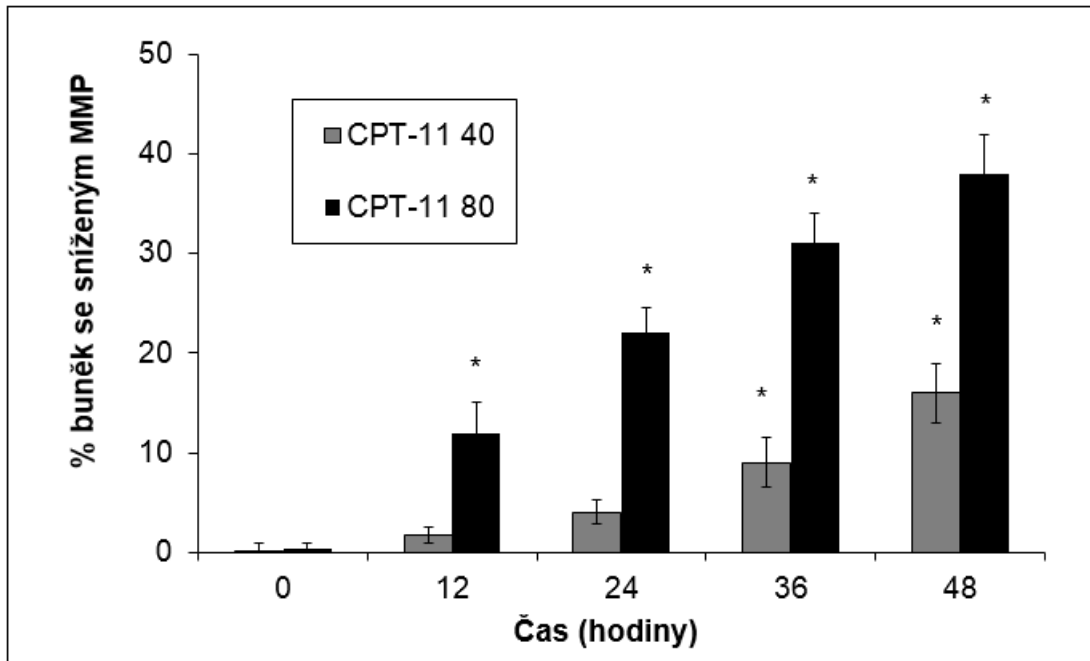
K

CPT 40

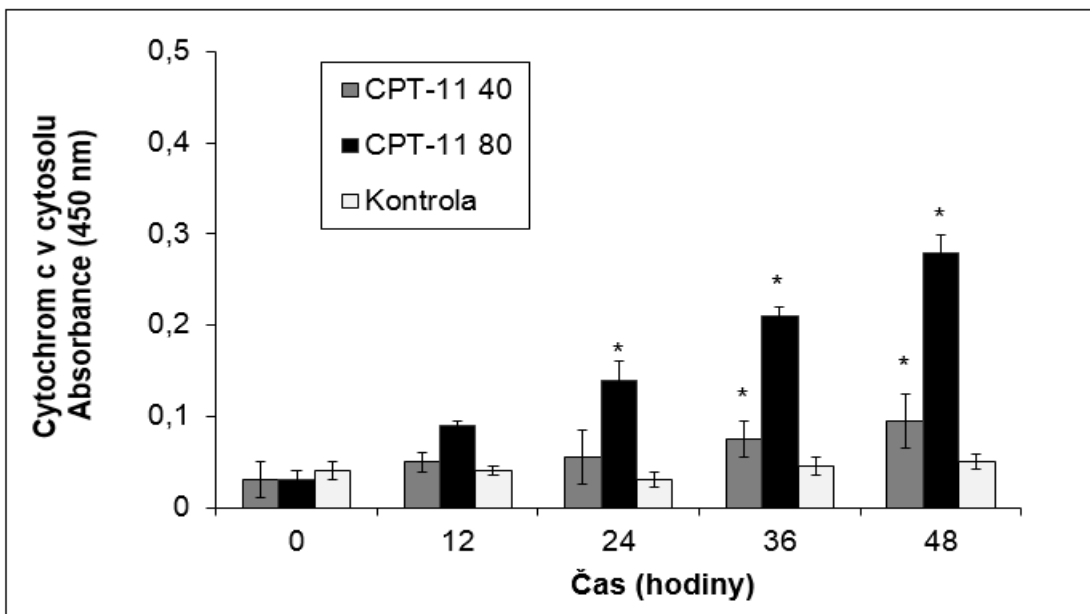
CPT 80



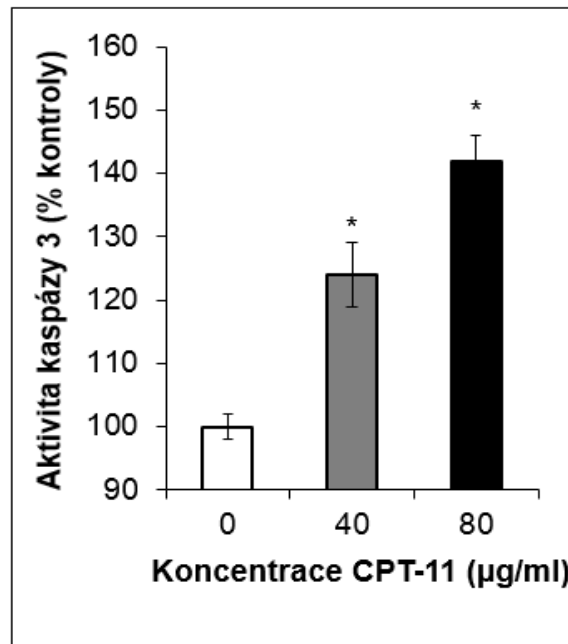
Obr. 26: Změny struktury jader buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80  $\mu\text{g/ml}$  v časovém intervalu 48 hodin. Fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 600x. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



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.



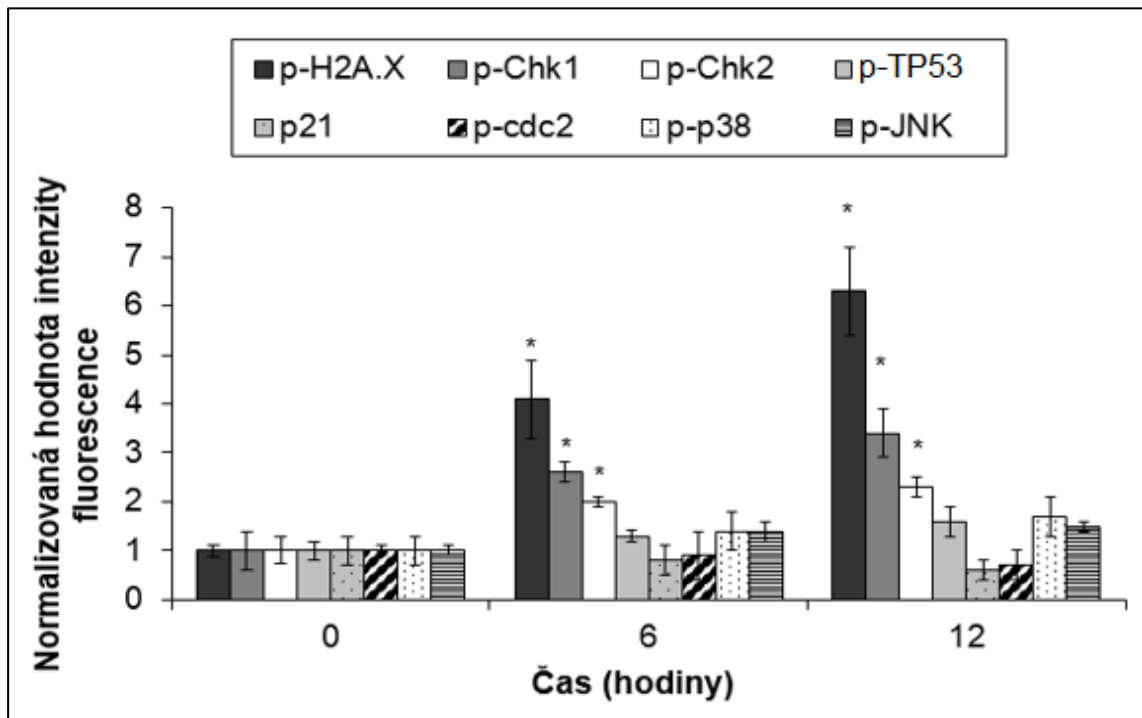
Obr. 29: Aktivace kaspázy-3 u buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0.05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu.

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

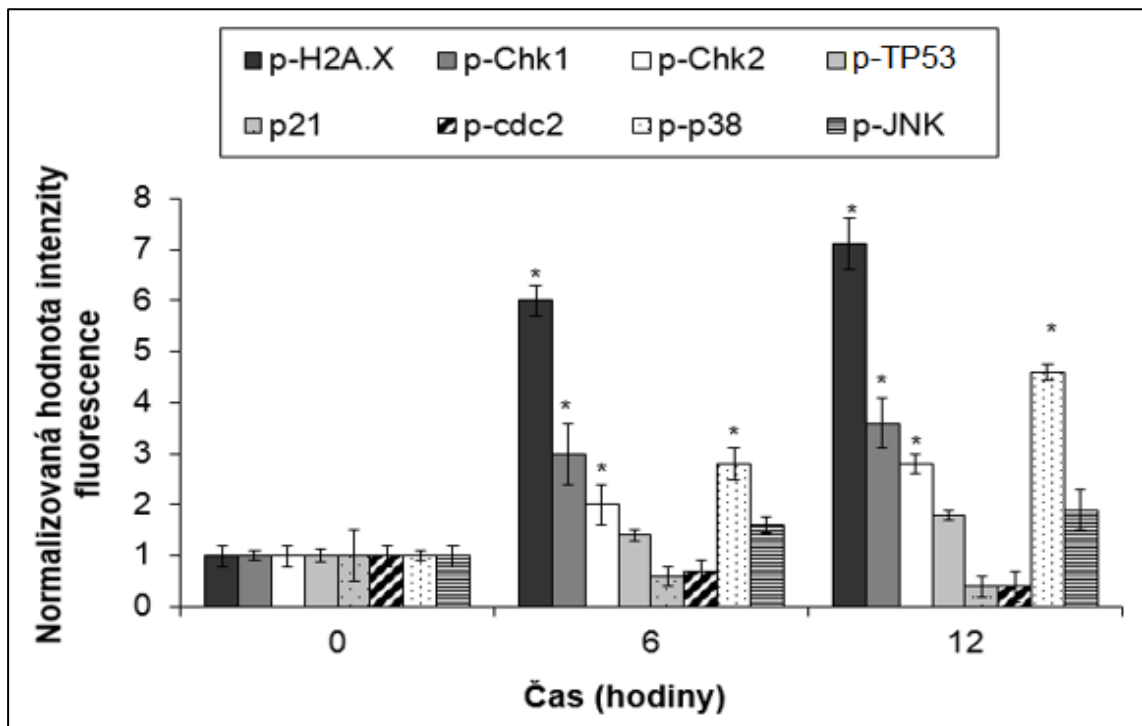
Vzhledem k tomu, že CPT-11 vyvolával buněčnou smrt – apoptózu, v další části našich studií jsme se podrobněji zaměřili na zapojení vybraných signálních stresových drah, a to prostřednictvím sledování aktivace klíčových elementů těchto drah. Buňky linie SW-620 vykazovaly po ovlivnění CPT-11 v dávce 40  $\mu\text{l/ml}$  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).



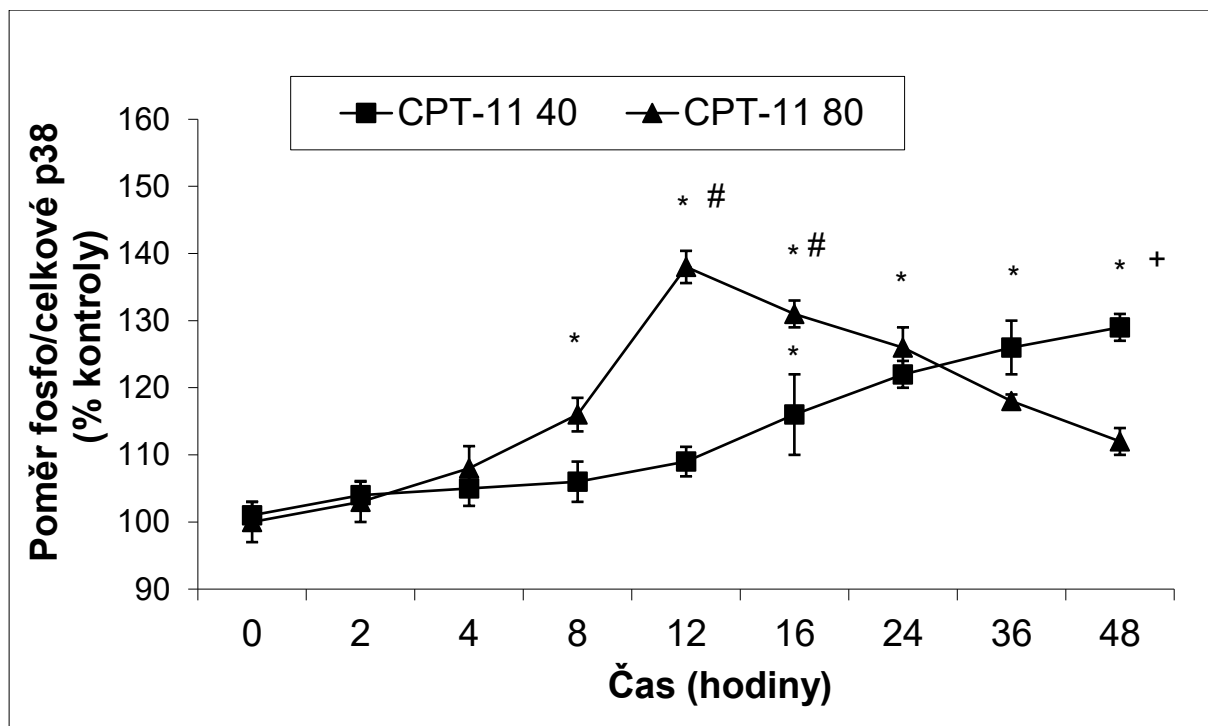
A



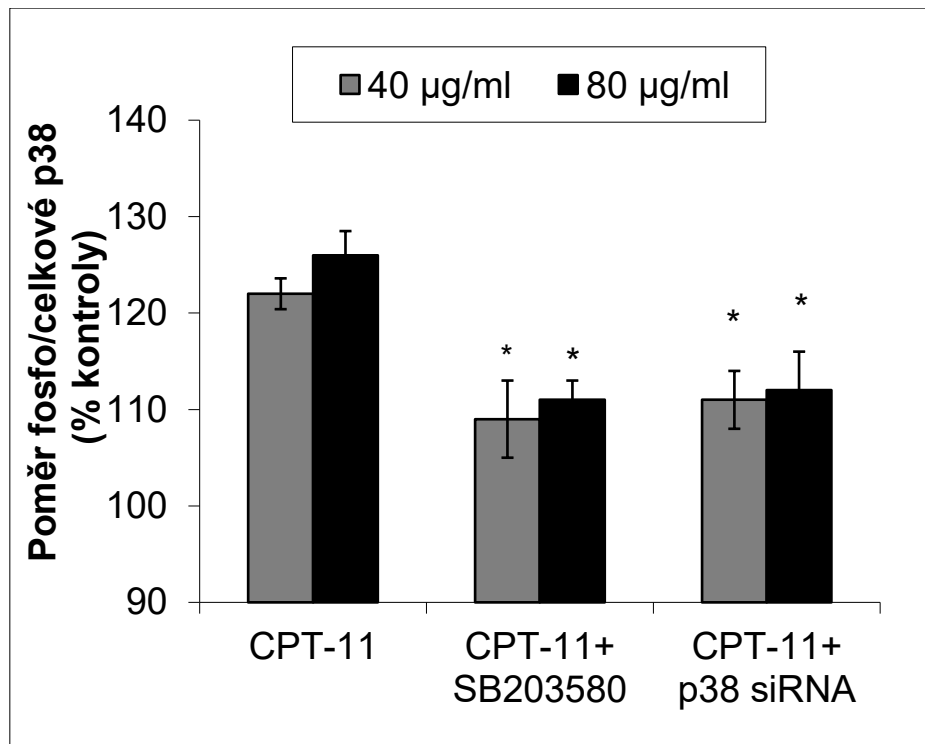
B



Obr. 30: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci (A) 40 µg/ml a (B) 80 µg/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.

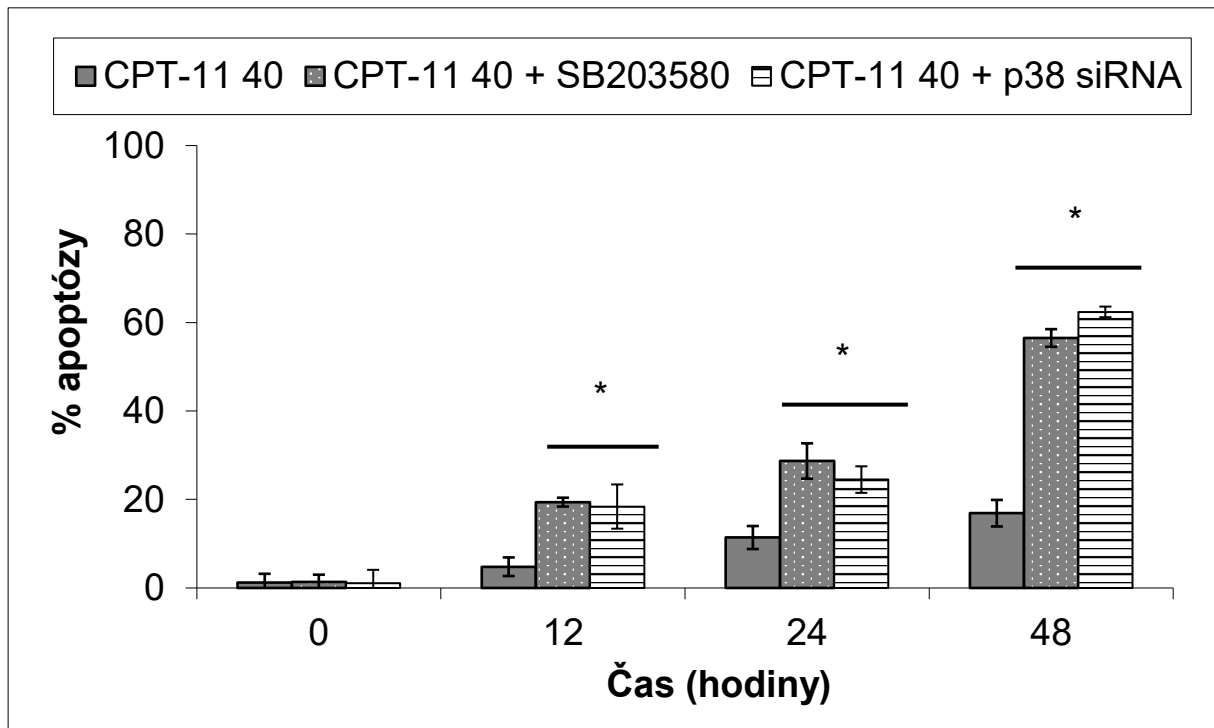


Obr. 31: Aktivita MAP kinázy p38 u buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 v porovnání počátkem ovlivnění, #P< 0,05 v porovnání s buňkami ovlivněnými CPT-11 v koncentraci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

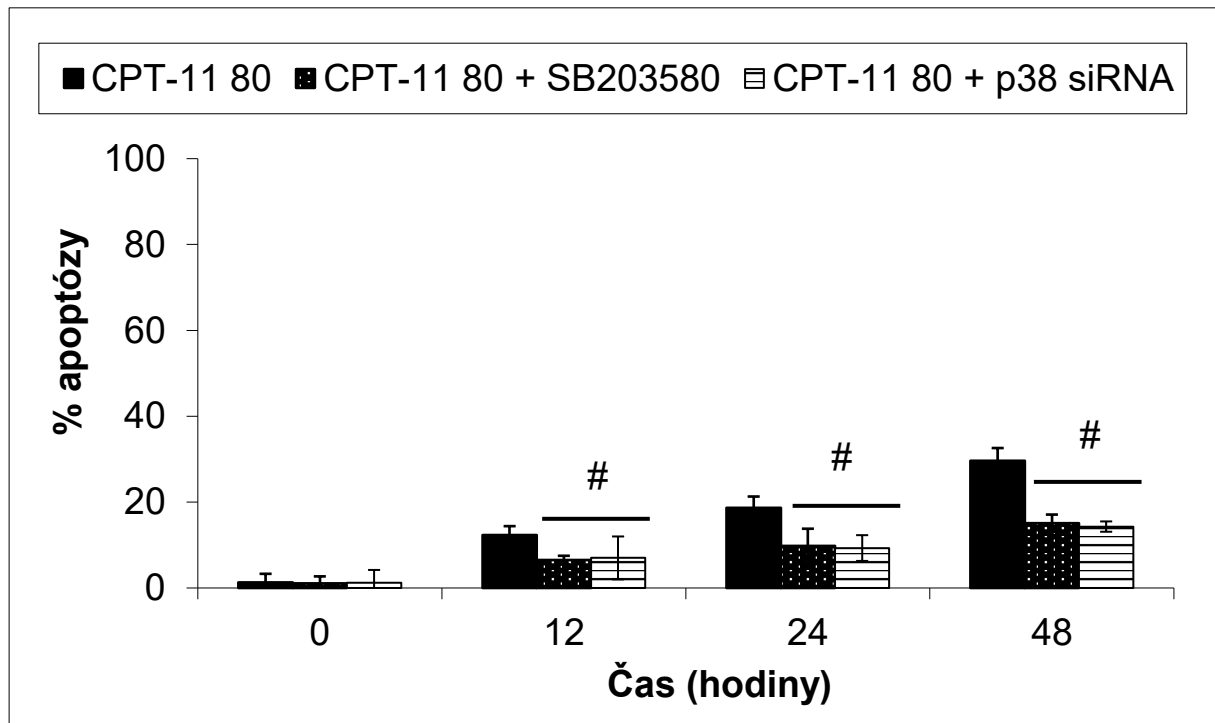


Obr. 32: Snížení aktivity MAPK kinázy p38 prostřednictvím specifického chemického inhibitoru SB203580 a/či genového utišení exprese (siRNA) u buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 40 a 80 µg/ml v časovém intervalu 48 hodin.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

A



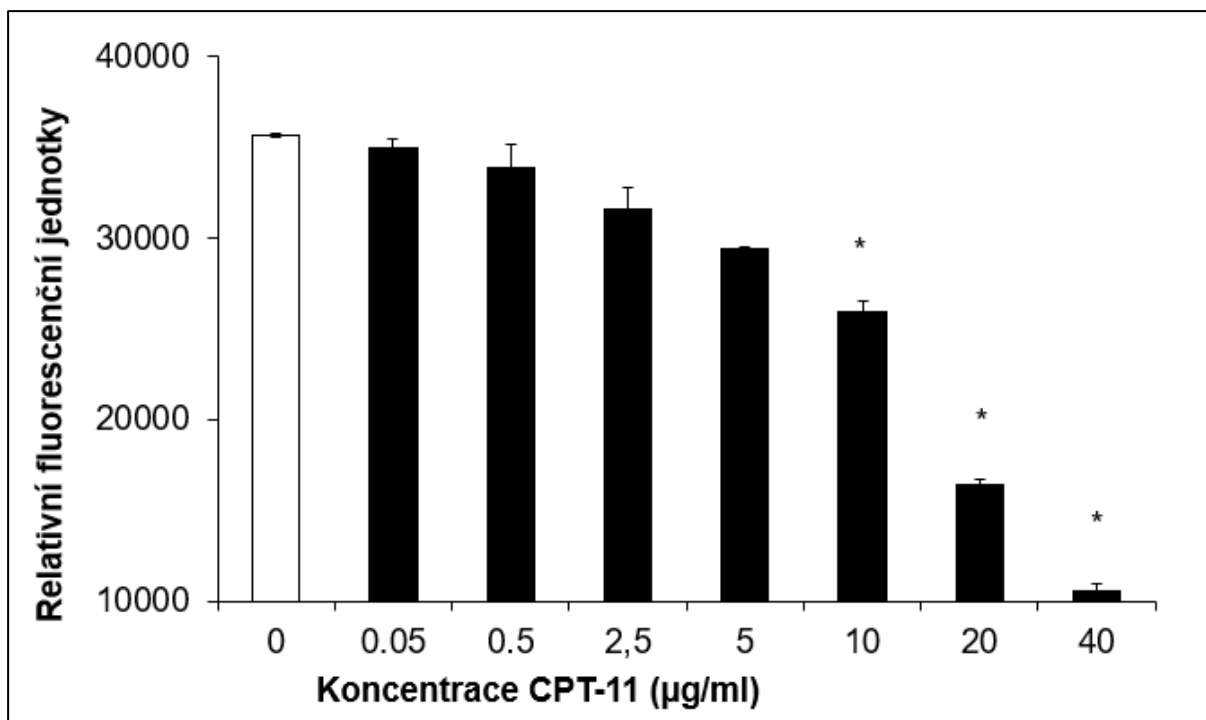
B



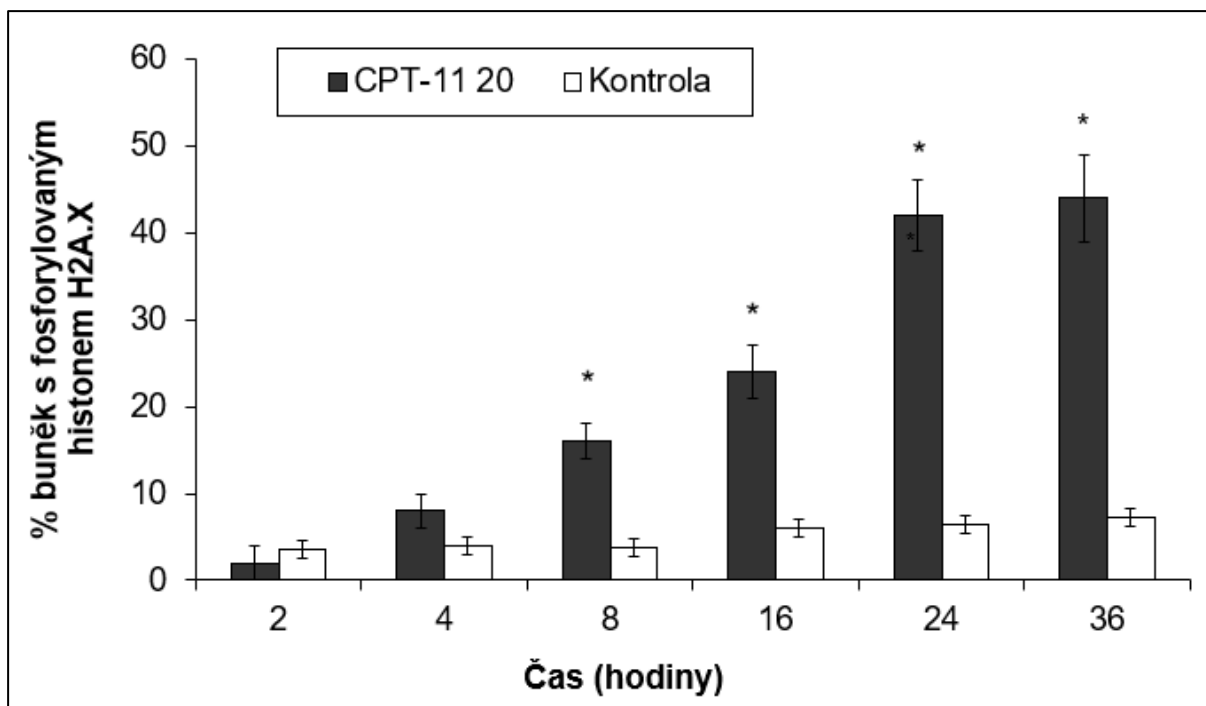
Obr. 33: Vliv inhibice MAPK kinázy p38 (chemický inhibitor SB203580 a siRNA) na apoptózu buněk linie kolorektálního karcinomu s mutovaným genem *TP53* – SW-620 po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci (A) 40 a (B) 80  $\mu\text{g/ml}$  v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání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

### 3.3.1 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-TP53KO). CPT-11 v časovém intervalu 48 hodin opět prokázal cytotoxický a antiproliferační účinek, který byl významný již od použité koncentrace 10  $\mu\text{g/ml}$ , jak bylo prokázáno testem syntézy DNA. K dalším experimentům byla vybrána koncentrace 20  $\mu\text{g/ml}$  jejíž cytotoxicita se pohybovala pod úrovní hodnoty  $\text{IC}_{50}$  (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).

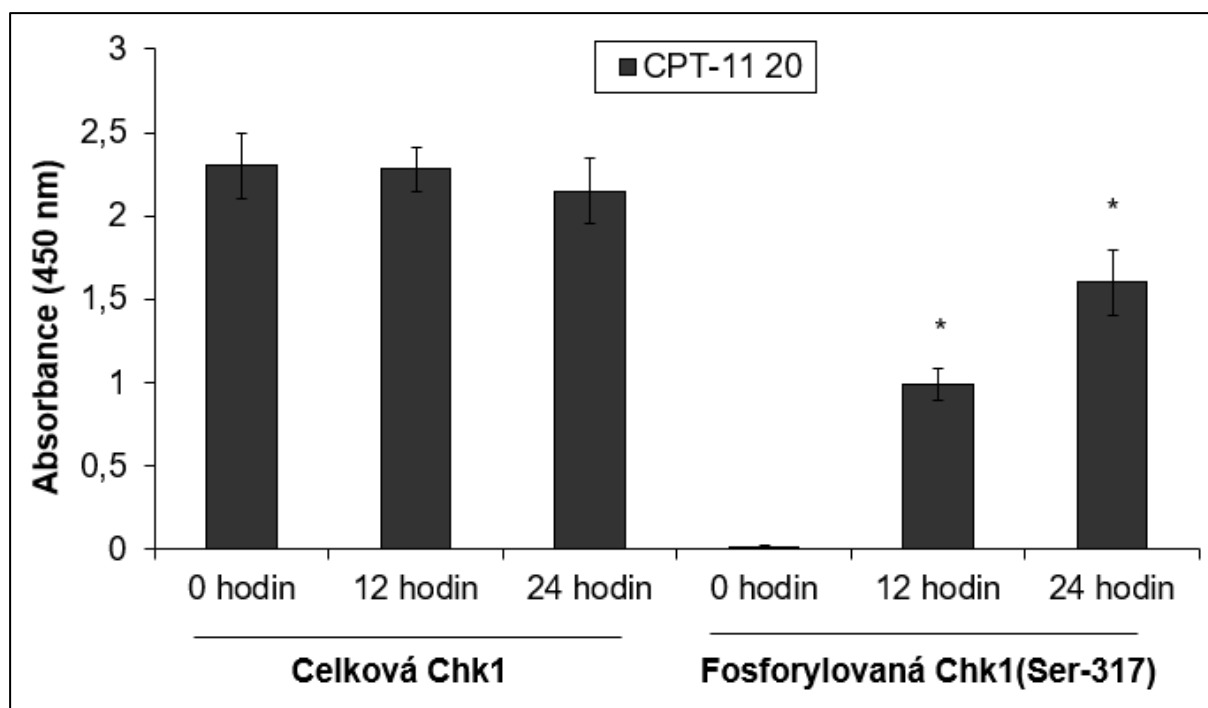


Obr. 34: Proliferace a viabilita linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po podání irinotekanu (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-40 µg/ml a v časovém intervalu 48 hodin stanovená prostřednictvím testu DNA syntézy. \* $P < 0,05$  v porovnání s neovlivněnými kontrolními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

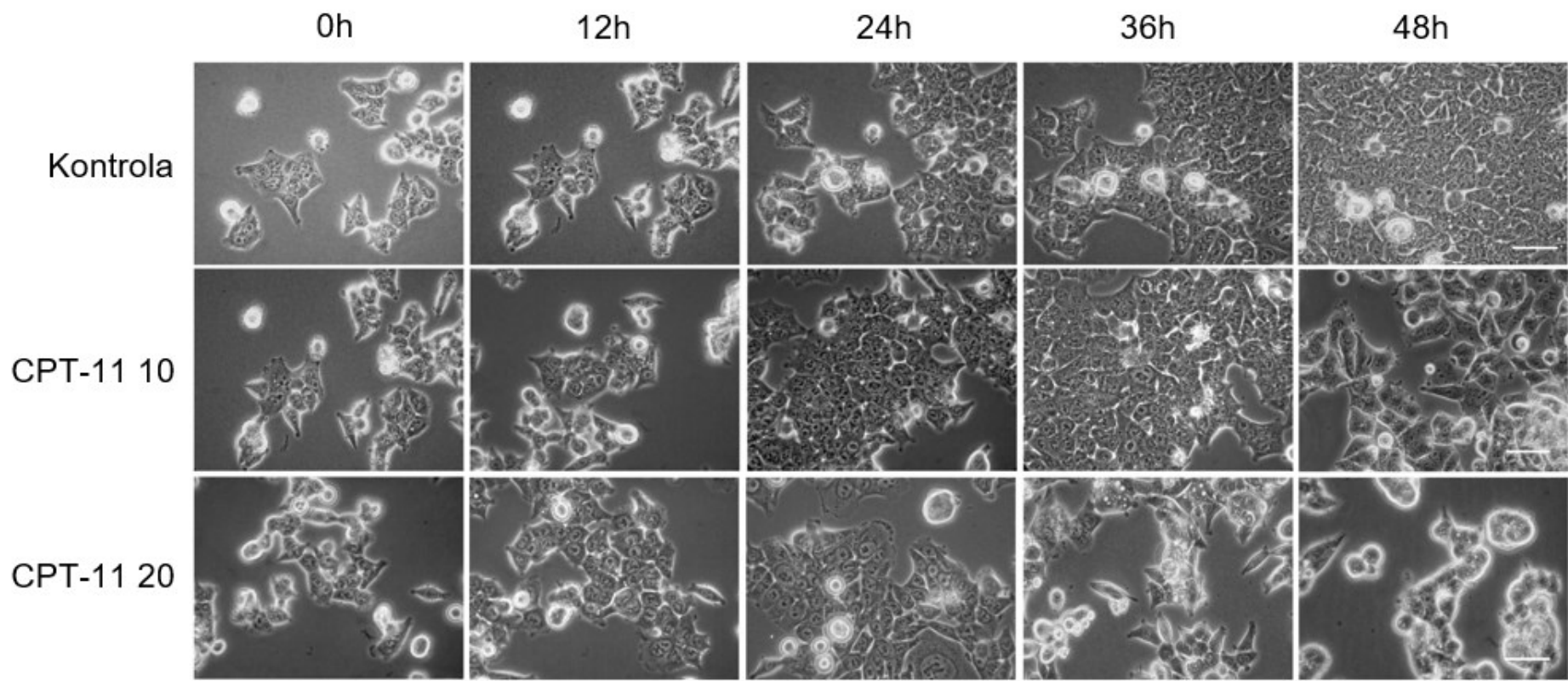




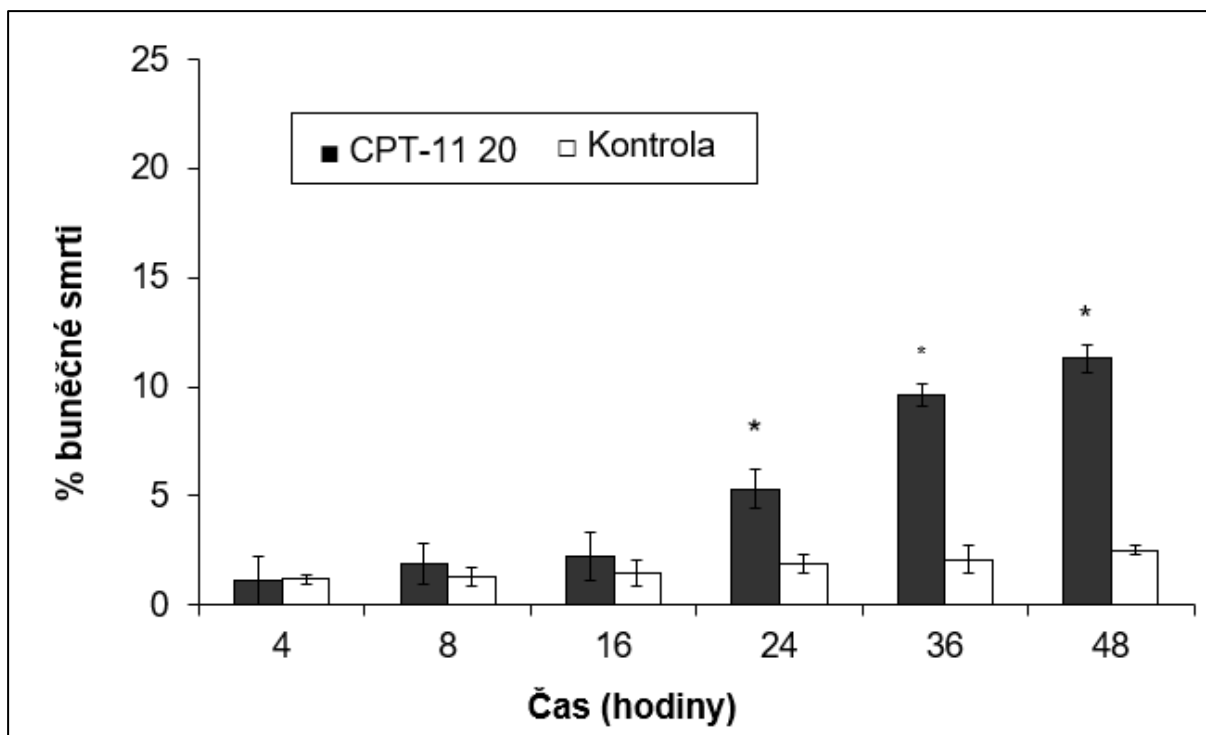
Obr. 36: Časový průběh aktivace stresové kinázy Chk1 u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po podání irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml a v časovém intervalu 24 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s počátkem ovlivnění.

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

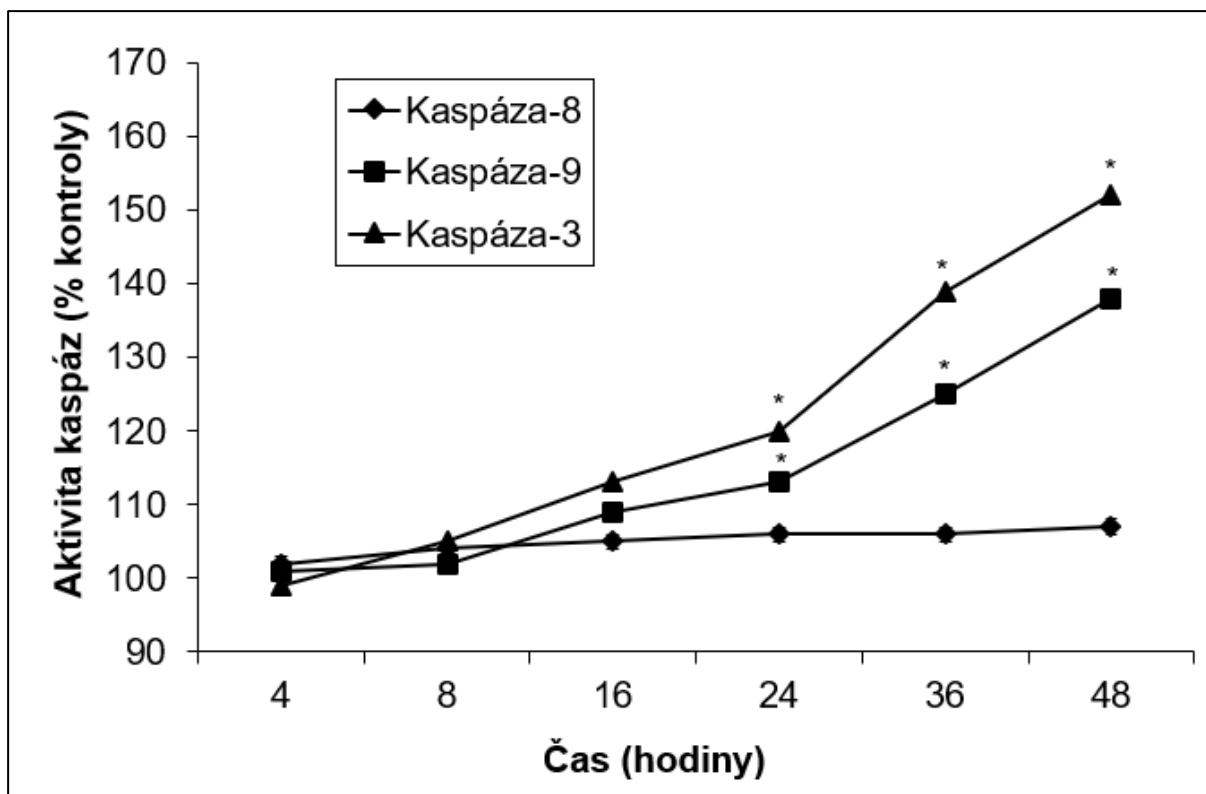
Oproti kontrolním kulturám, byla u CPT-11 ovlivněných buněk mikroskopicky pozorována nižší proliferace a morfologické změny zahrnující cytoplazmatickou vakuolizaci, buněčné smršťování, ztrátu adherence a tvorbu membránových protruzí – blebů (Obr. 37). Přítomnost indukované apoptózy u ovlivněných buněk byla následně potvrzena cytometricky, přičemž časoběrné 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. Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .

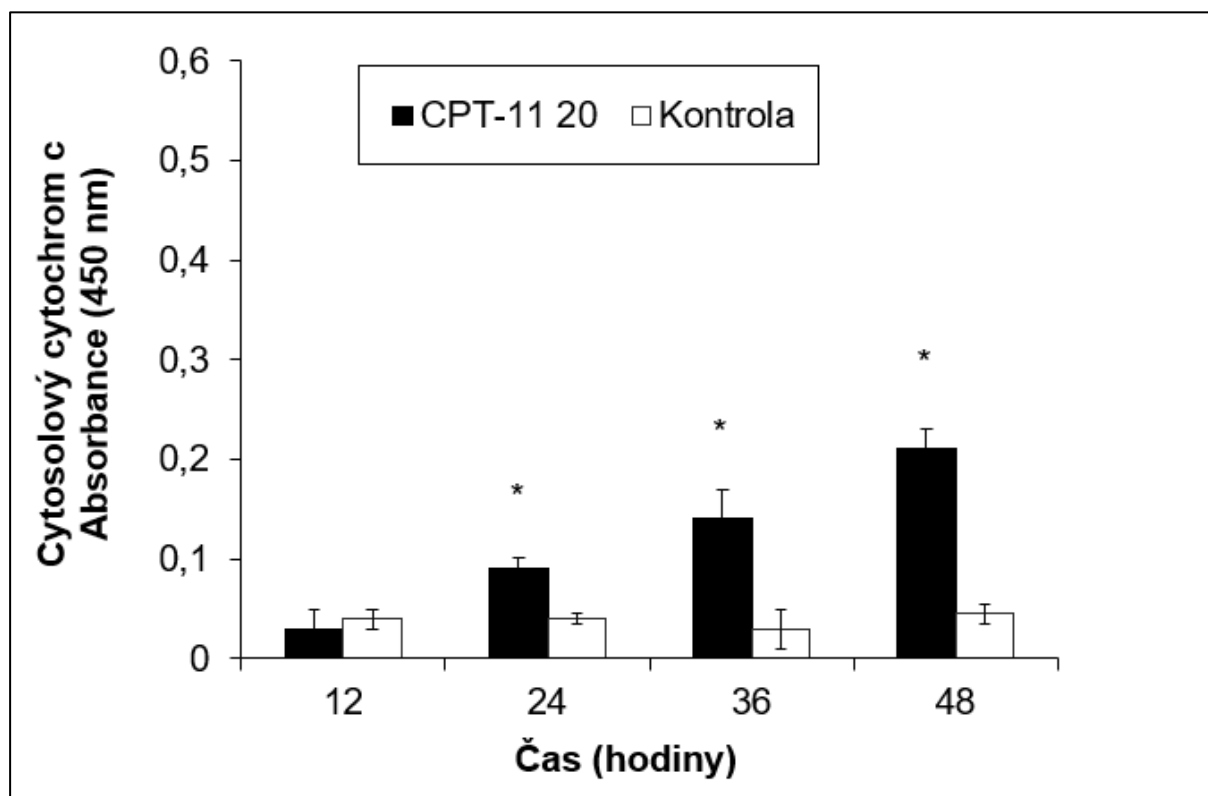


Obr. 38: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  na buněčnou smrt linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami ve stejném časovém intervalu

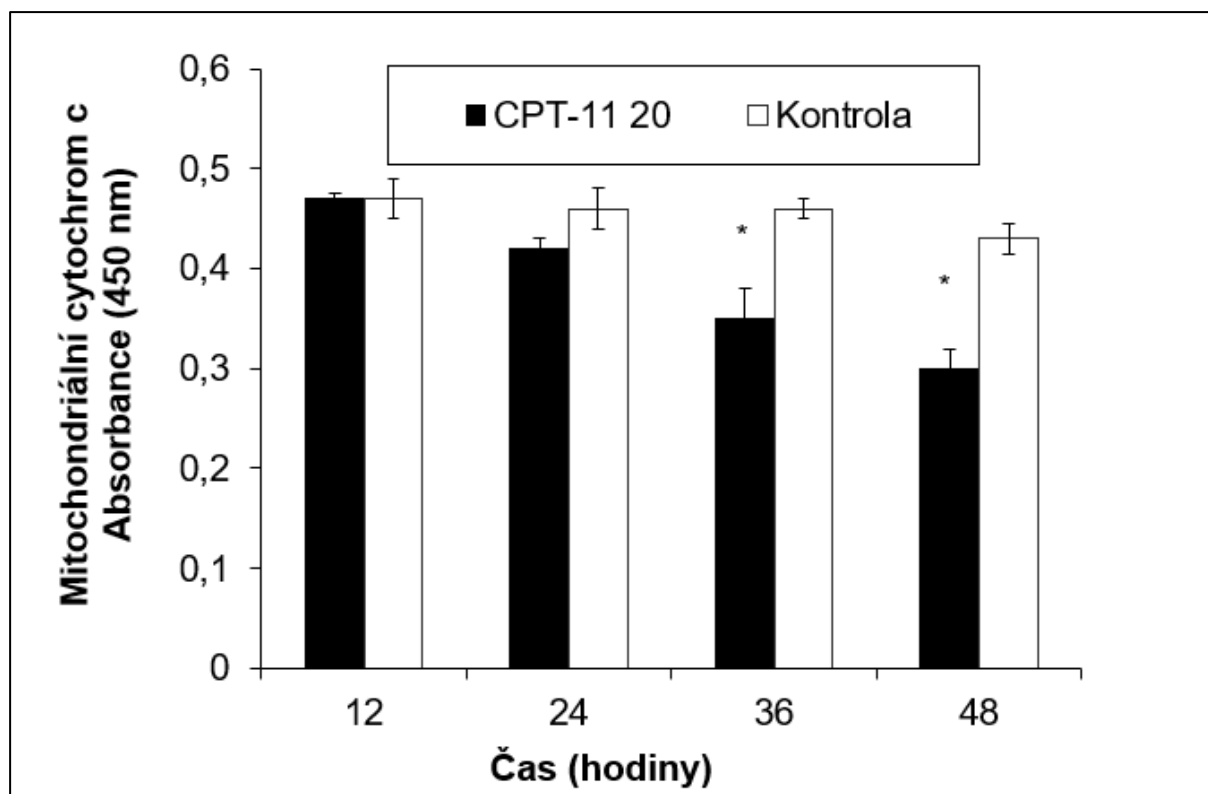


Obr. 39: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  na aktivitu kaspázy-8, -9 a -3 u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO v časovém intervalu 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s počátkem ovlivnění

A



B



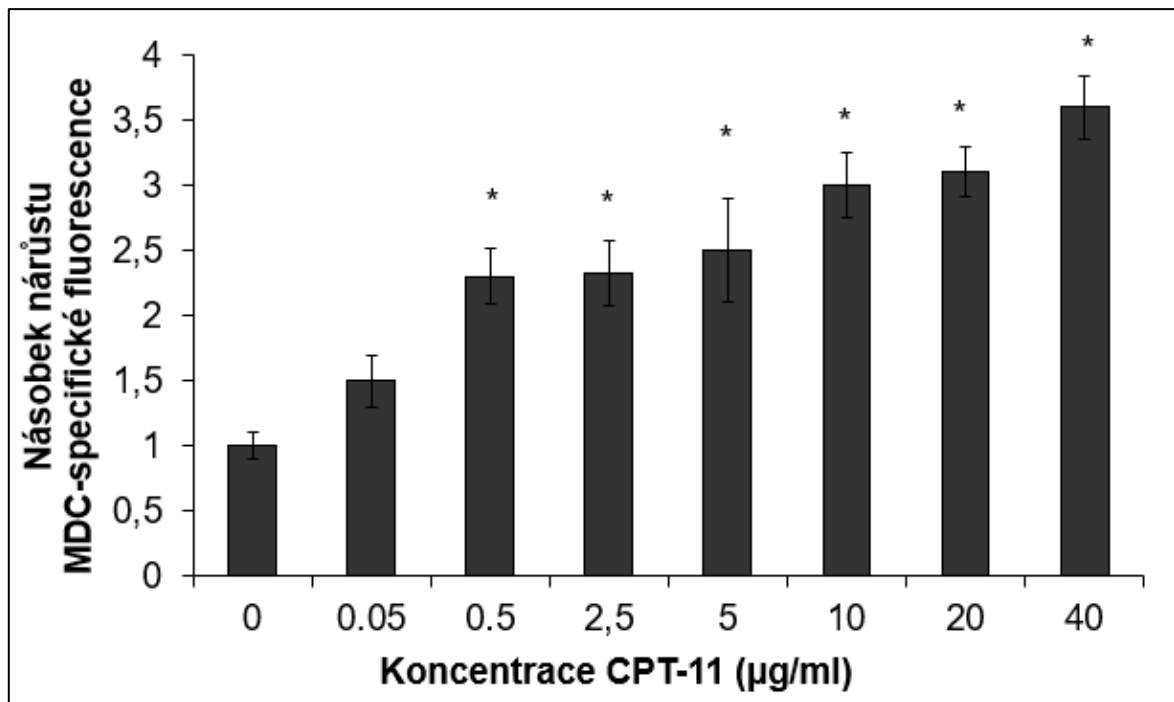
Obr. 40: Vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml na uvolňování cytochromu c z mitochondrií (A) do cytoplazmy (B) u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO v časovém intervalu 48 hodin. \*P< 0,05 v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném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

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

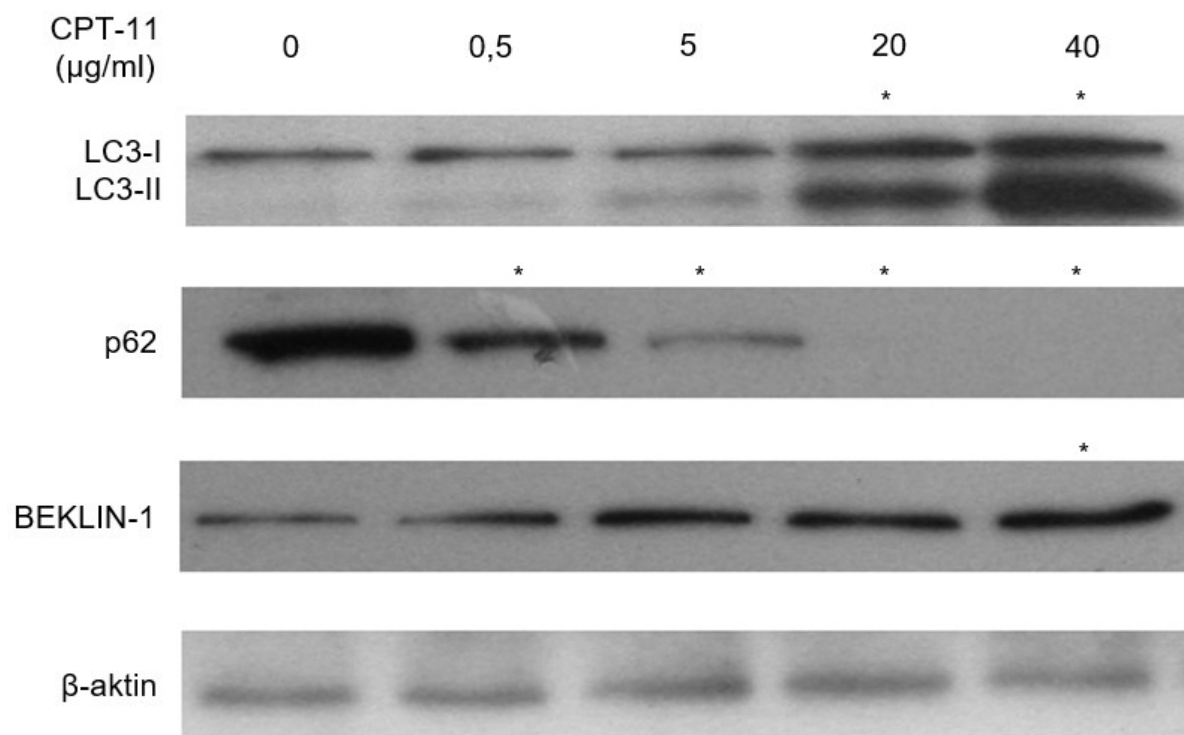
Morfologická analýza buněk, pozvolný nástup projevů apoptózy i její celková úroveň u ovlivněných buněk naznačovala možnou přítomnost a zapojení další buněčné odpovědi na tento druh stresu. Jedním z možných kandidátů mohla být zvýšená úroveň autofagie – coby obranný buněčný mechanismus. V dalším kroku 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 µg/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 časná 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 µg/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 kyselých fosfatáz 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, kyselých fosfatáz a nízkou expresí COX-IV (obr. 47 a 48).

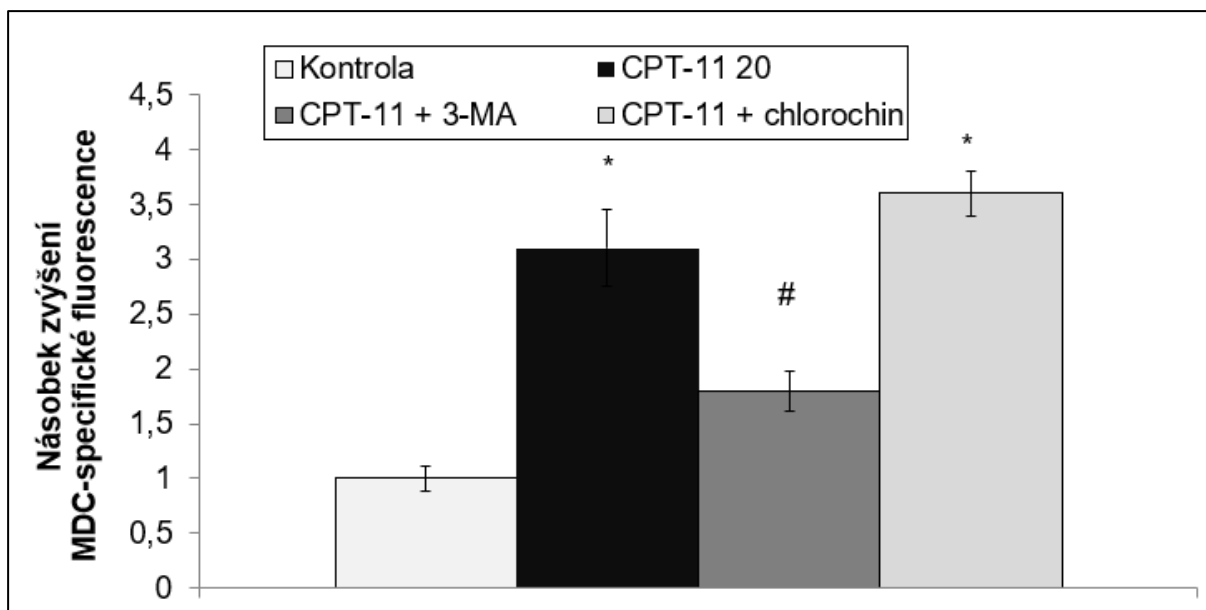




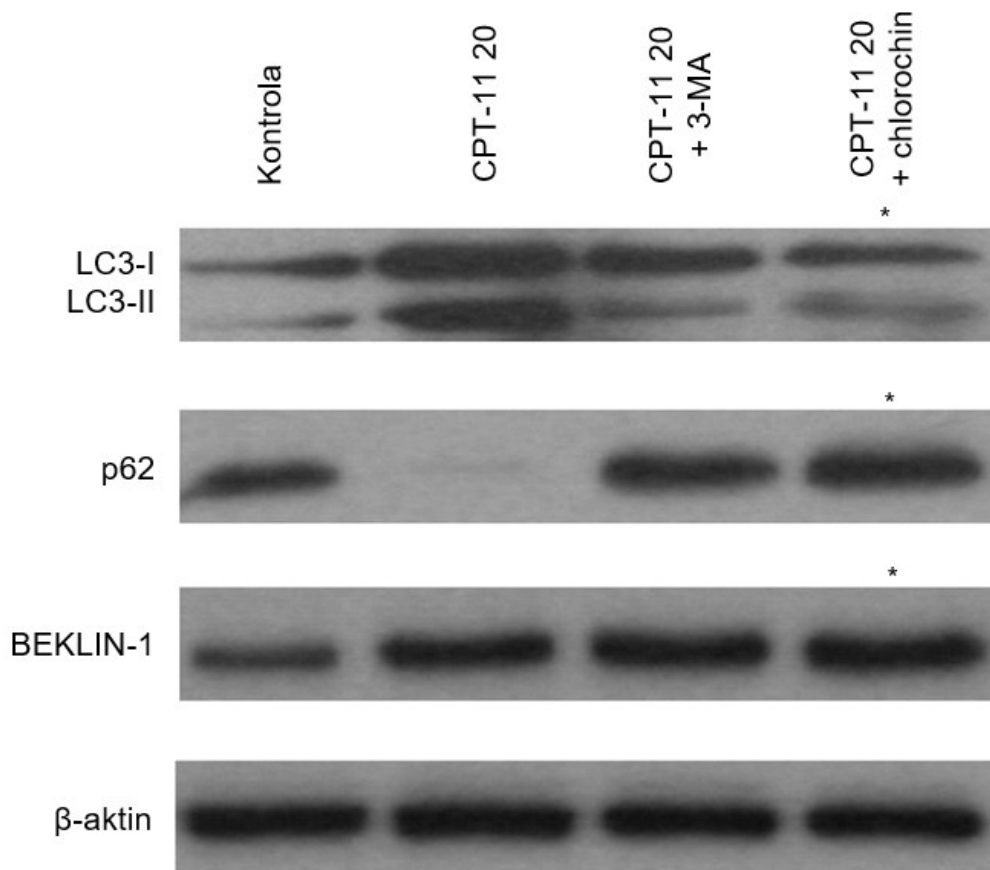
Obr. 41: MDC-specifická fluorescence buněk odpovídající autofagii u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-40 µg/ml v časovém intervalu 36 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými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



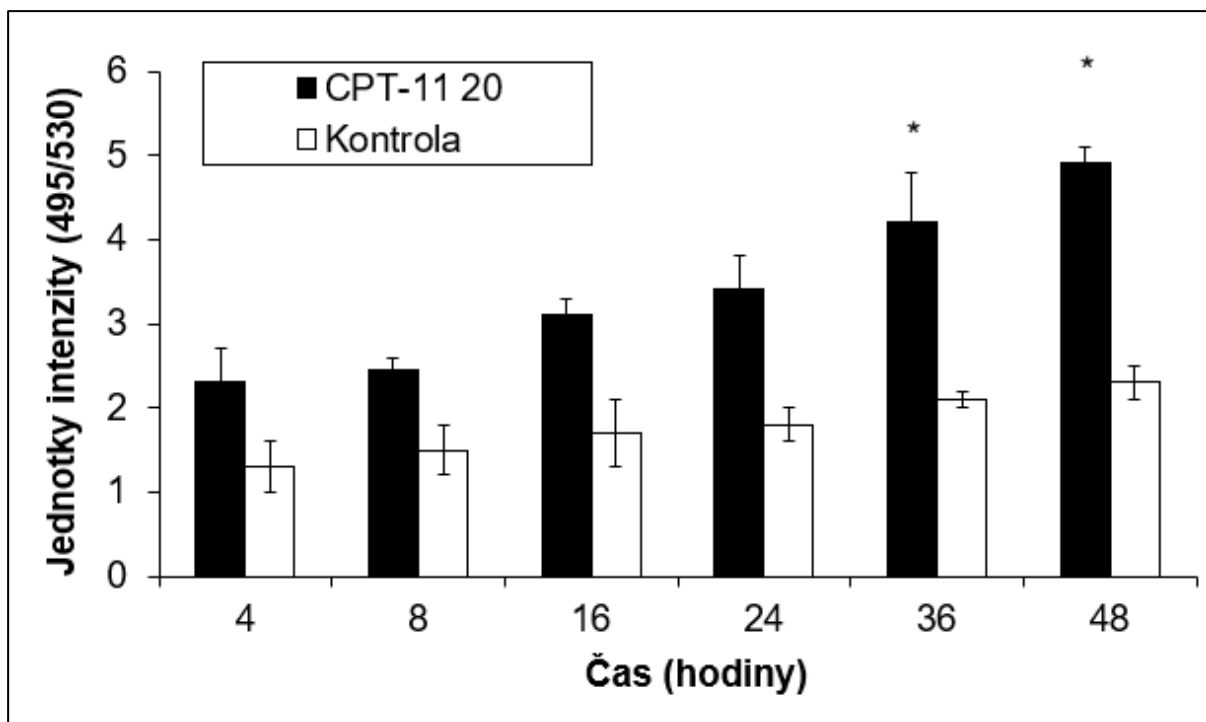
Obr. 42: Změny v expresi vybraných markerů autofagie buněk u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentračním rozmezí 0-40  $\mu\text{g/ml}$  v časovém intervalu 36 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty 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  $\mu\text{g/ml}$  (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.

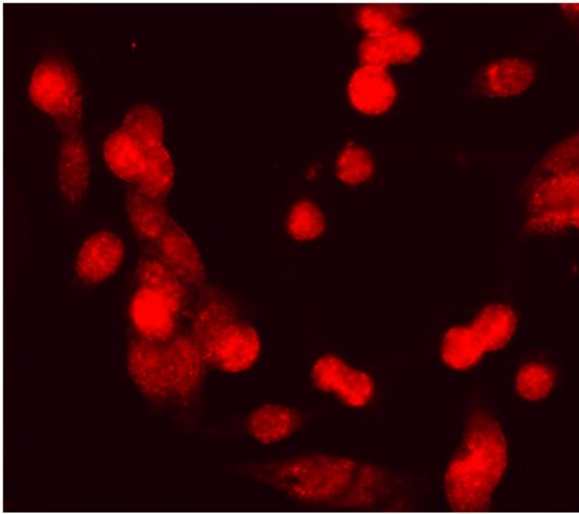


Obr. 44: Změny v expresi vybraných markerů autofagie buněk u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml (samotný) nebo spolu se specifickými inhibitory autofagie (3-MA, chlorochin) v časovém intervalu 36 hodin.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

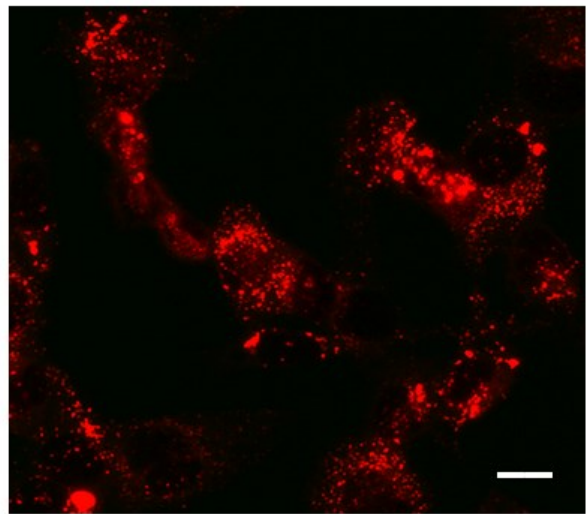


Obr. 45: Časový průběh permeabilizace lysosomální membrány u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml během 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami ve stejném časovém intervalu.

A

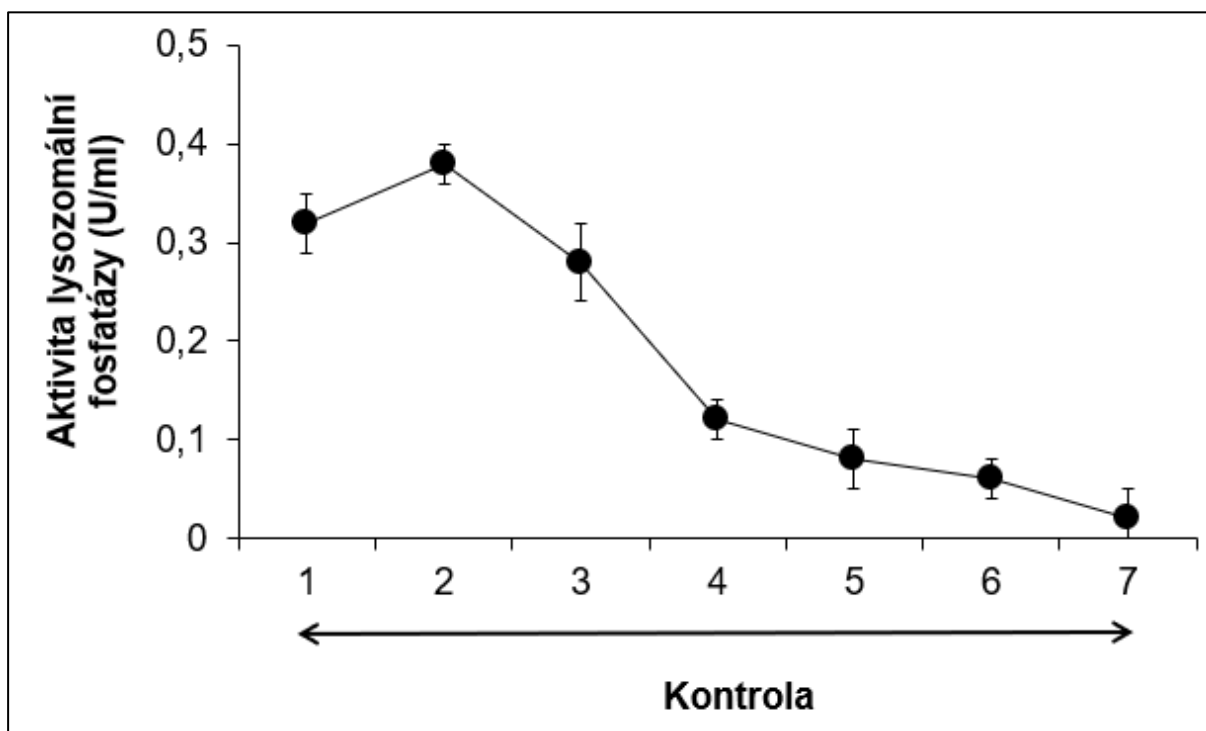


B

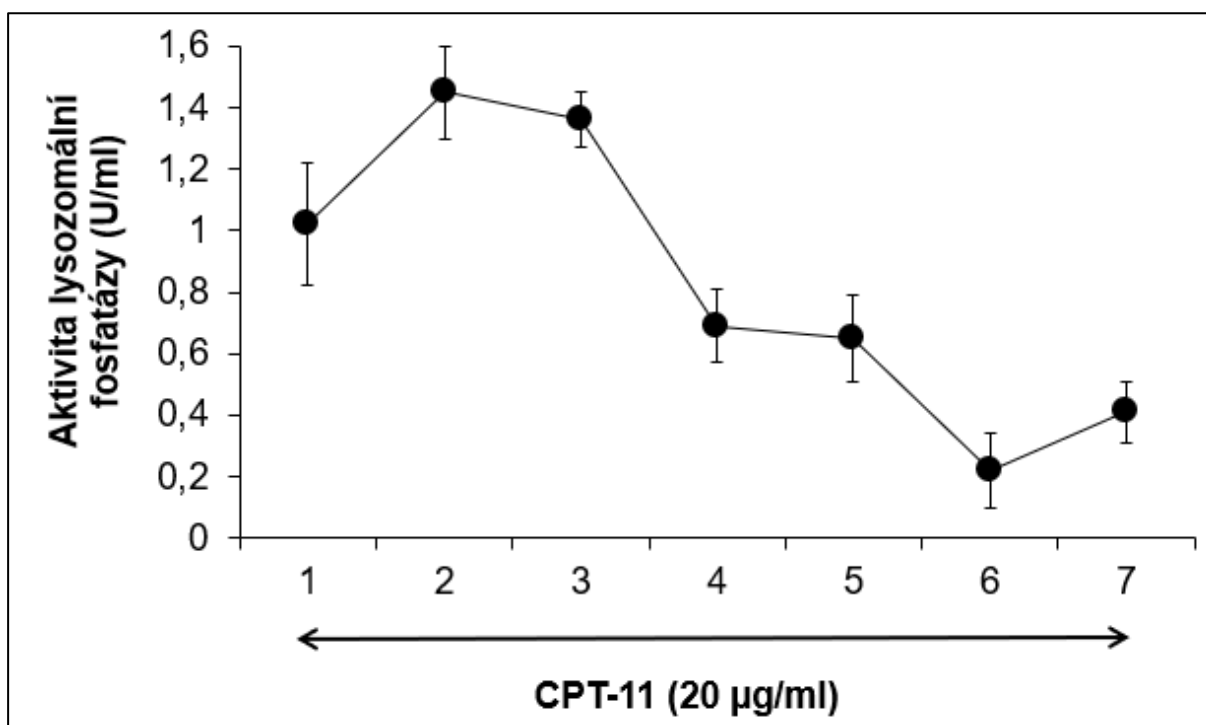


Obr. 46: Permeabilizace lysosomální membrány u linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  během 36 hodin. (A) Čas 0 (B) čas 36 hodin. Fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 200x, měřítko 10  $\mu\text{m}$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

A

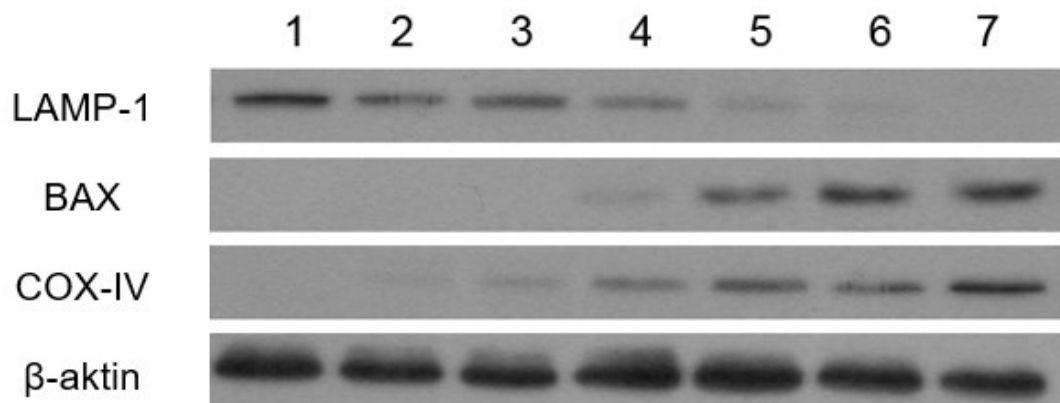


B

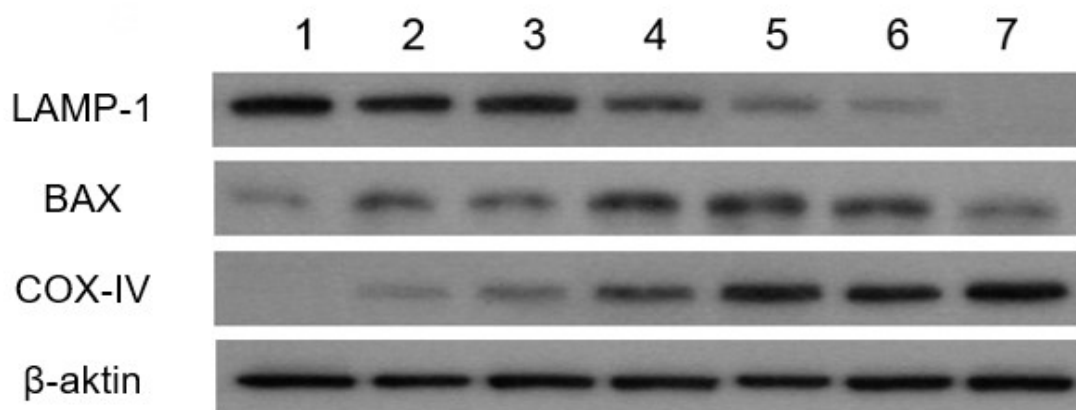


Obr. 47: Aktivita lysozomální fosfatázy v lysozomálních a mitochondriálních frakcích buněk linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20 µg/ml během 36 hodin. (A) Kontrolní neovlivněné buňky (B) Buňky vystavené CPT-11.

A



B

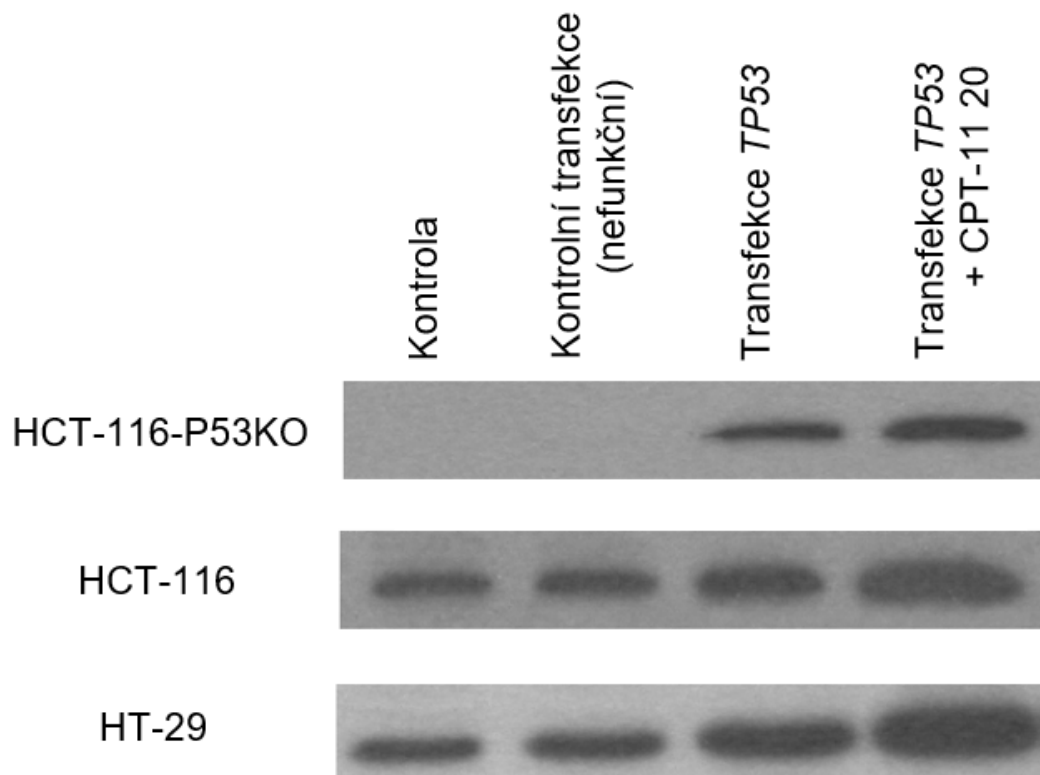


Obr. 48: Lokalizace proteinu BAX v lysozomálních a mitochondriálních frakcích buněk linie kolorektálního karcinomu s uměle odstraněným genem *TP53* - HCT-116-TP53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  během 36 hodin. (A) Kontrolní neovlivněné buňky (B) Buňky vystavené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

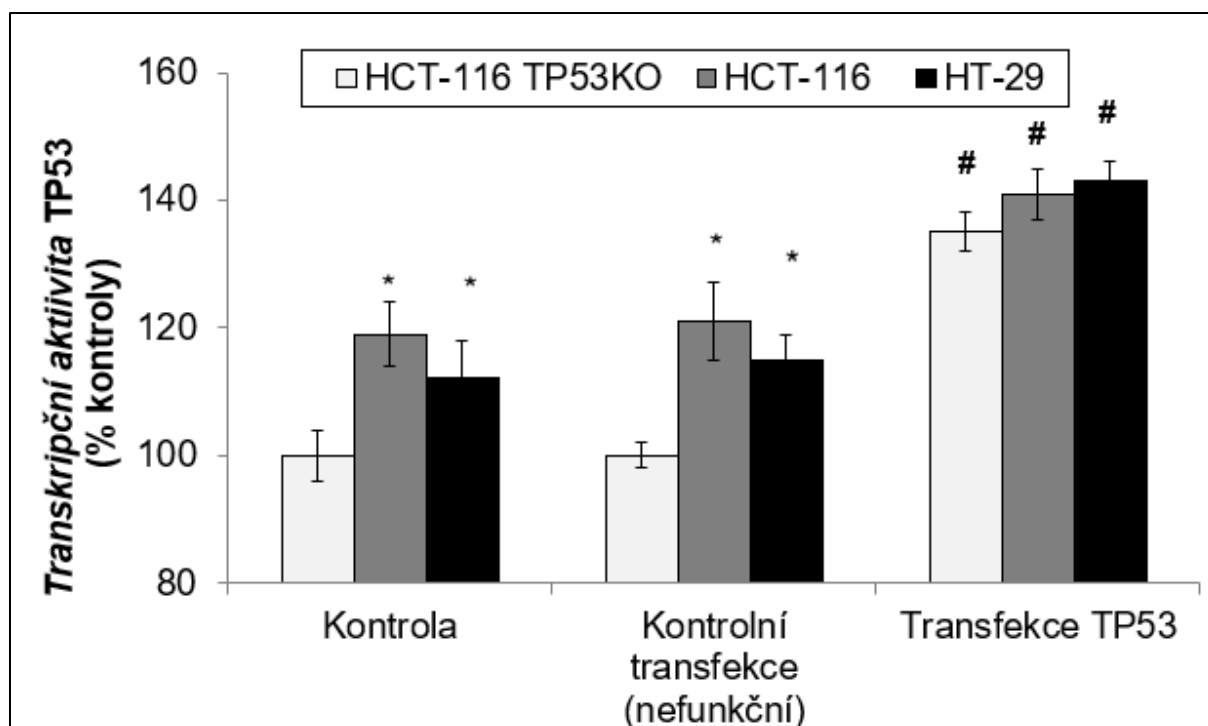


### 3.3.4 Vliv exprese proteinu TP53 na CPT-11 stimulovanou buněčnou smrt u nádorových střevních buněk s odstraněným *TP53*

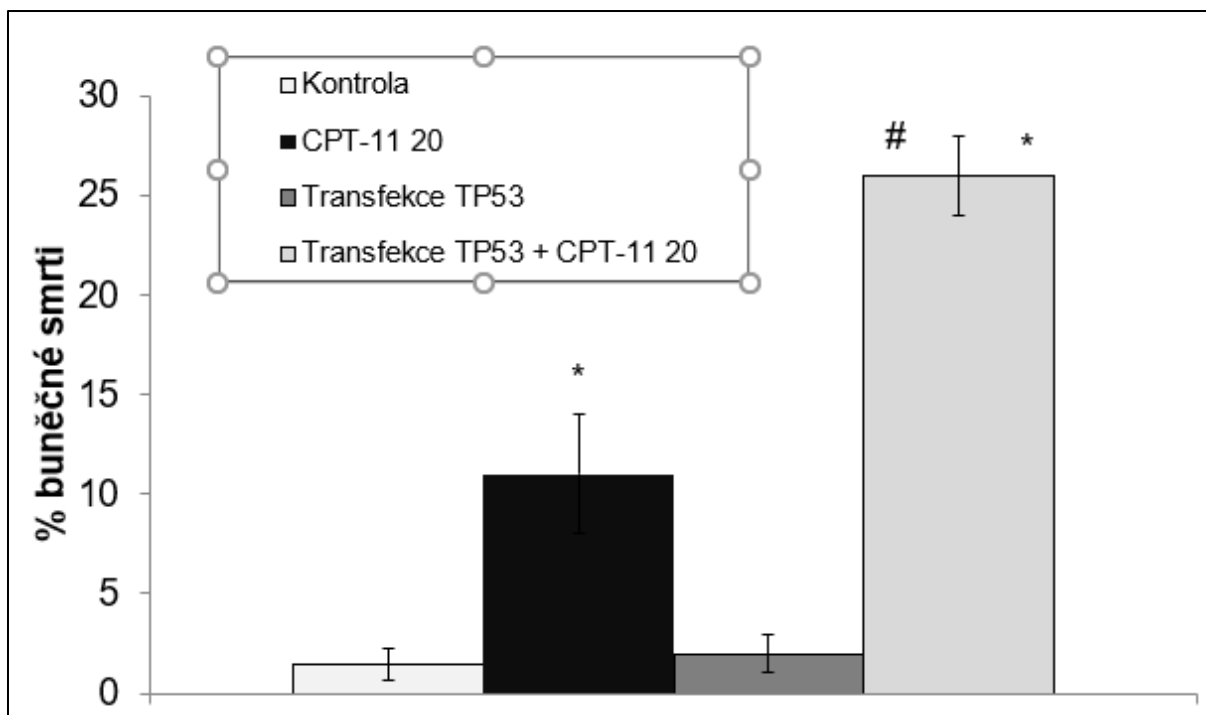
CPT-11 indukoval u stávající linie HCT-116-TP53KO apoptózu, nicméně v omezené míře a za současného zvýšení exprese autofagie a jejich markerů, což naznačovalo možný funkční vztah obou buněčných fenotypů k expresi TP53. Pro ověření této hypotézy jsme transfekovali HCT-116-TP53KO, ale i další CRC linie 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).



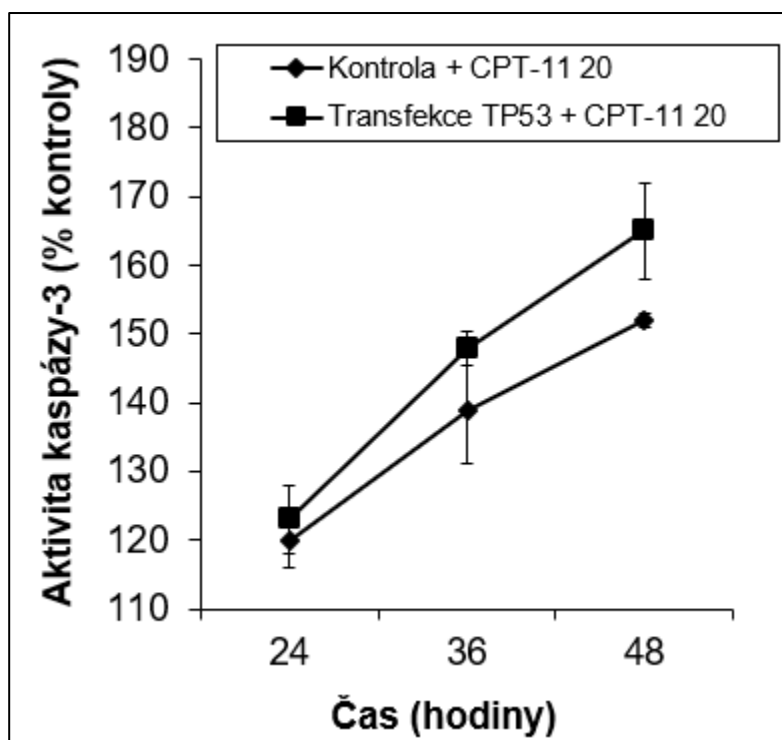
Obr. 49: Expresi proteinu TP53 v transfekovaných buňkách linií kolorektálního karcinomu s divokou formou genu *TP53* (HCT-116), odstraněným genem *TP53* (HCT-116-P53KO) či mutovaným (HT-29) genem *TP53* a vliv irinotekanu (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  na tuto expresi v časovém intervalu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



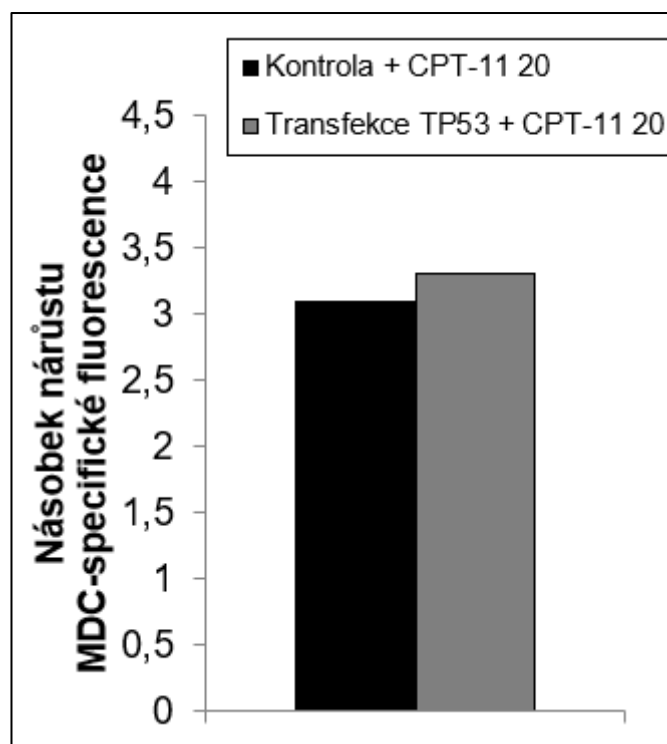
Obr. 50: Transkripční aktivita proteinu TP53 v netransfekovaných a transfekovaných buňkách linií kolorektálního karcinomu s divokou formou genu *TP53* (HCT-116), odstraněným genem *TP53* (HCT-116-P53KO) či mutovaným (HT-29) genem *TP53* ovlivněných irinotekanem (CPT-11) v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  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.



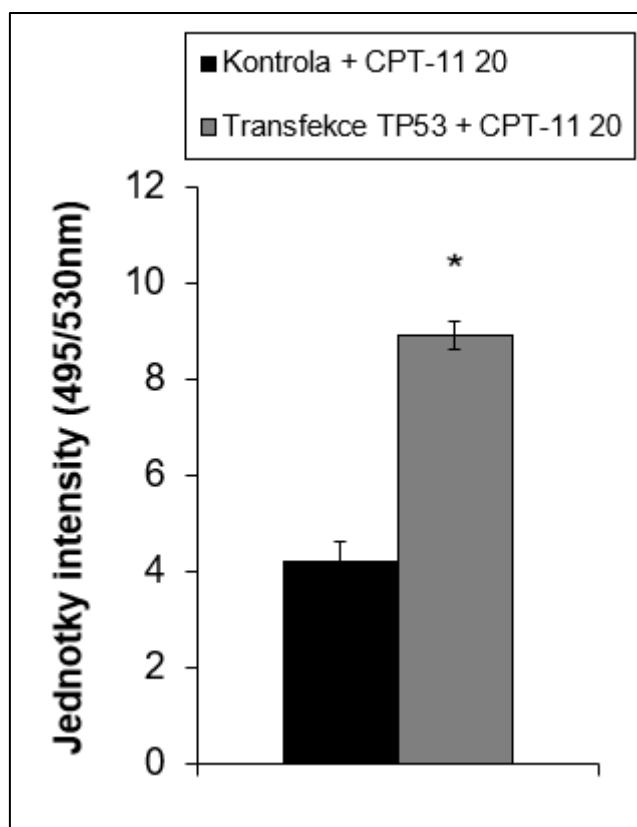
Obr. 52: Vliv exprese proteinu TP53 na irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) indukovanou aktivitu kaspázy-3 v časovém intervalu 48 hodin u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO.



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.

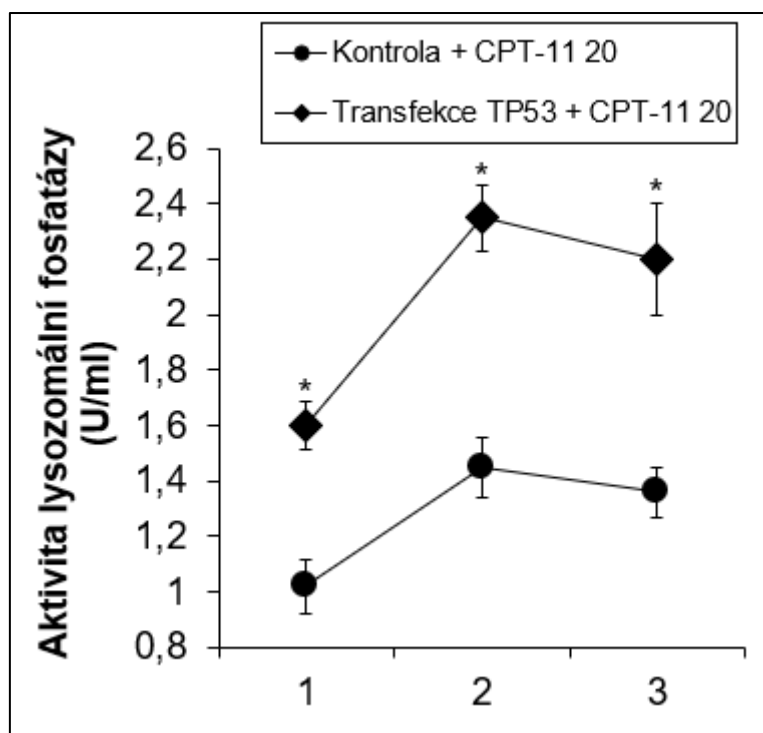
### 3.3.5 Význam proteinu BAX v buněčné smrti indukované CPT-11 u nádorových střevních buněk s odstraněným *TP53*

U buněk linie HCT-116-TP53KO vystavené CPT-11 jsme pozorovali zvýšení lysozomální permeability a aktivity lysozomální 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 téže 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).

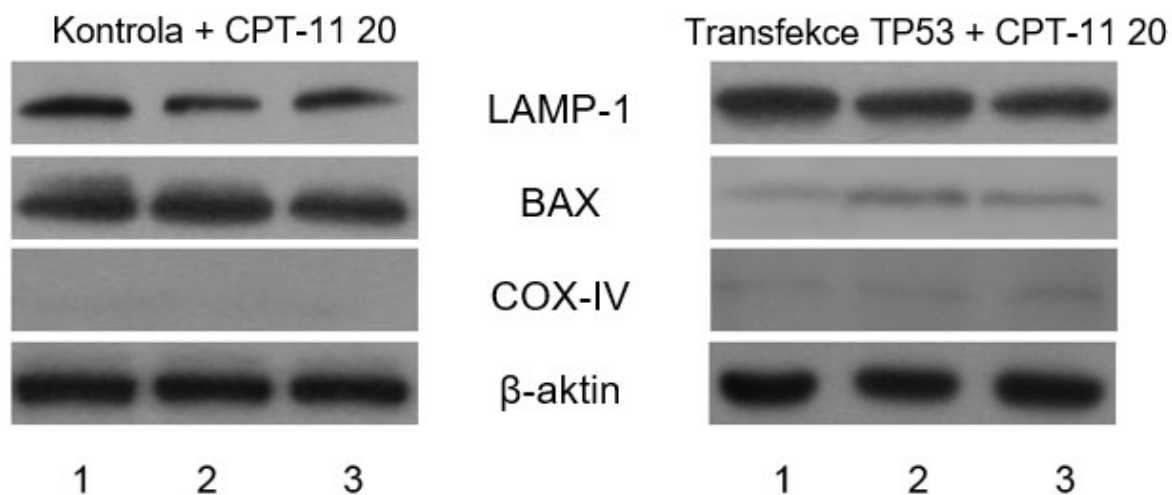


Obr. 54: Vliv exprese proteinu TP53 na lysosomální permeabilizaci u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) během 48 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními netransfekovanými buňkami.

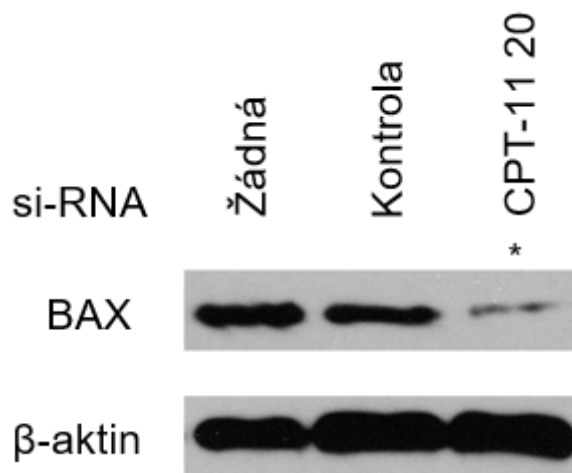




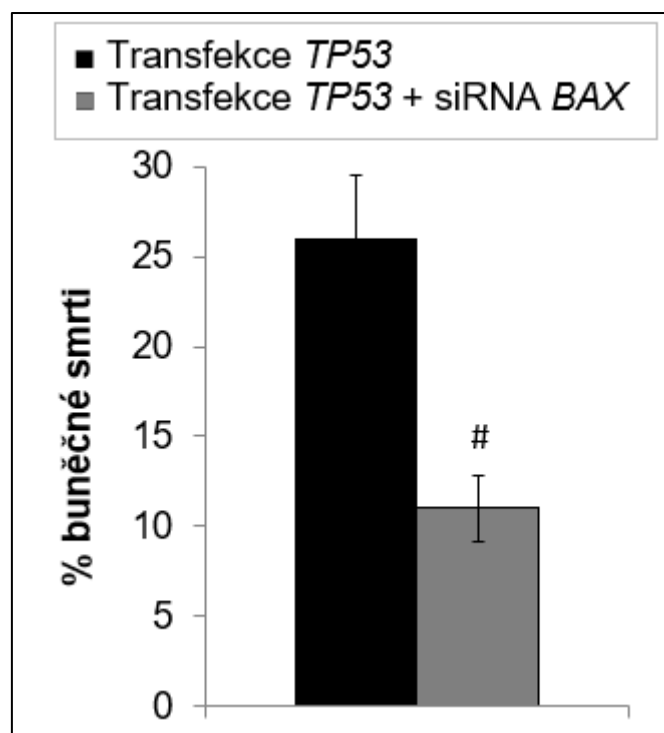
Obr. 55: Vliv exprese proteinu TP53 na aktivitu lysosomální fosfatázy v lysosomálních frakcích 1-3 buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) během 36 hodin. \* $P < 0,05$  v porovnání s kontrolními netransfekovanými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



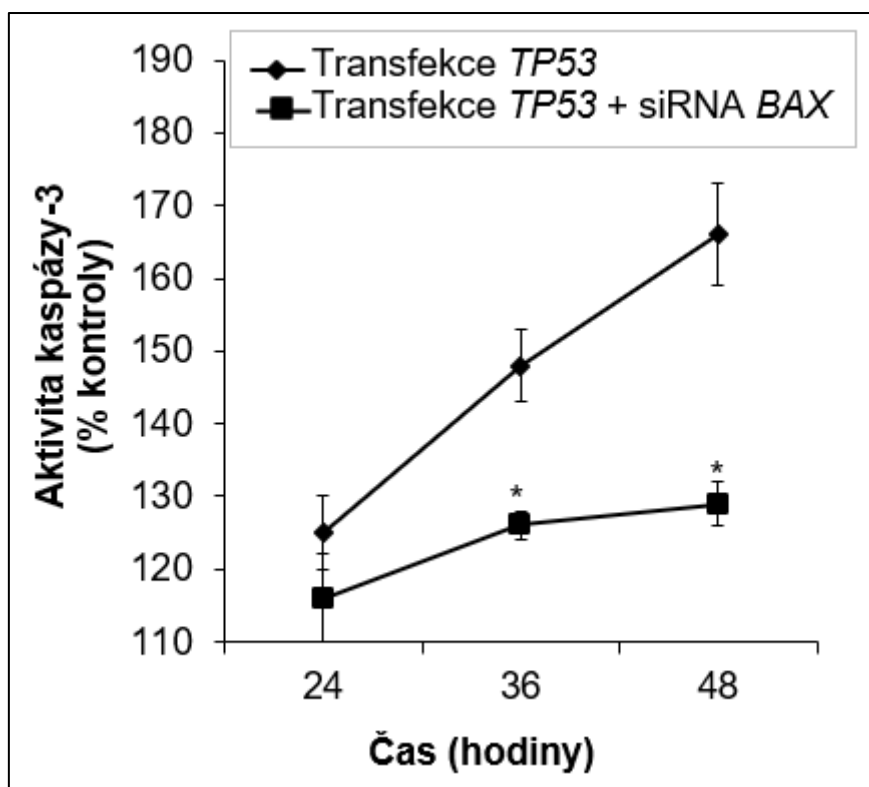
Obr. 56: Vliv exprese proteinu TP53 na lokalizaci proteinu BAX v lysosomálních frakcích 1-3 u buněk linie kolorektálního karcinomu s odstraněným genem *TP53* - HCT-116-P53KO po ovlivnění irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) během 36 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty byly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



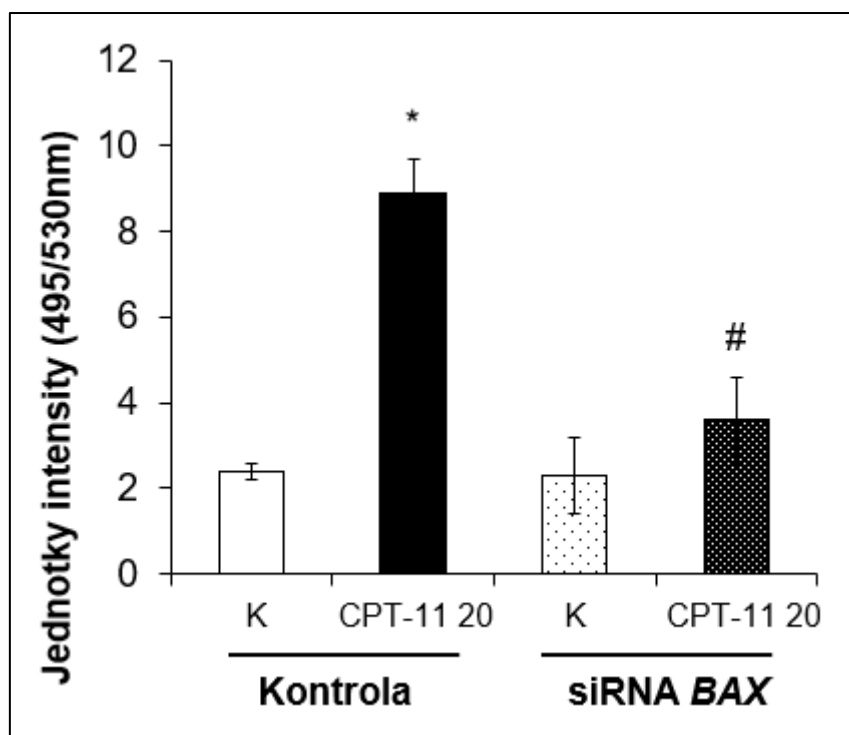
Obr. 57: Exprese proteinu BAX po specifickém umlčení jeho genu metodou siRNA u buněk linie kolorektálního karcinomu s transfekovaným genem *TP53* - HCT-116-P53TR. ovlivněných irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) v časovém intervalu 48 hodin. Nanášecí kontrola – aktin. Výsledné imunoblotty byly 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  $\mu\text{g/ml}$ ) 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 buňkami s normální expesí 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 expesí BAX.



Obr. 60: Vliv snížené exprese proteinu BAX (metoda siRNA) na irinotekanem (CPT-11, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) indukovanou permeabilitu lysozomální 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 expesí BAX.

### 3.2 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 mg/m<sup>2</sup> a plazmatické koncentrace takto dosahují 1-10 µg/ml (Mathijssen *et al.* 2002; Vanhoefer *et al.* 2001). V rámci intraarteriálního podání mohou 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 β-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 mechanismů 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 resistance 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 popsáných 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 časné i pozdní fáze 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.

## Část 4.

## 4.1 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  $\mu\text{g/ml}$  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.

## Část 5.

## 5.1. Seznam použité literatury

- ABIDA, W. M. AND W. GU p53-Dependent and p53-independent activation of autophagy by ARF. *Cancer Res*, Jan 15 2008, 68(2), 352-357.
- ABRAHA, A. M. AND E. B. KETEMA Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World J Gastrointest Oncol*, Aug 15 2016, 8(8), 583-591.
- AHN, T. S., D. JEONG, M. W. SON, H. JUNG, et al. The BRAF mutation is associated with the prognosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, Nov 2014, 140(11), 1863-1871.
- AN, C. H., M. S. KIM, N. J. YOO, S. W. PARK, et al. Mutational and expressional analyses of ATG5, an autophagy-related gene, in gastrointestinal cancers. *Pathol Res Pract*, Jul 15 2011, 207(7), 433-437.
- ARENDS, J. W. Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol*, Mar 2000, 190(4), 412-416.
- ASANGANI, I. A., S. A. RASHEED, D. A. NIKOLOVA, J. H. LEUPOLD, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, Apr 3 2008, 27(15), 2128-2136.
- BAN, K. AND R. A. KOZAR Glutamine protects against apoptosis via downregulation of Sp3 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Dec 2010, 299(6), G1344-1353.
- BANDYOPADHYAY, U., S. KAUSHIK, L. VARTICOVSKI AND A. M. CUERVO The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol*, Sep 2008, 28(18), 5747-5763.
- 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.
- BEAUSEJOUR, C. M., A. KRTOLICA, F. GALIMI, M. NARITA, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*, Aug 15 2003, 22(16), 4212-4222.
- 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.
- BENCHIMOL, S. p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ*, Nov 2001, 8(11), 1049-1051.
- BOLEIJ, A., E. M. HECHENBLEIKNER, A. C. GOODWIN, R. BADANI, et al. The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin Infect Dis*, Jan 15 2015, 60(2), 208-215.
- 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.
- BROCARDO, M. AND B. R. HENDERSON APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. *Trends Cell Biol*, Dec 2008, 18(12), 587-596.
- 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.

CESEN, M. H., K. PEGAN, A. SPES AND B. TURK Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res*, Jul 01 2012, 318(11), 1245-1251.

CIZNADIJA, D., R. TOTHILL, M. L. WATERMAN, L. ZHAO, et al. Intestinal adenoma formation and MYC activation are regulated by cooperation between MYB and Wnt signaling. *Cell Death Differ*, Nov 2009, 16(11), 1530-1538.

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.

DEAN, L. Irinotecan Therapy and UGT1A1 Genotype. In V. PRATT, H. MCLEOD, L. DEAN, A. MALHEIRO AND W. RUBINSTEIN eds. *Medical Genetics Summaries*. Bethesda (MD), 2012.

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.

FLEMING, N. I., R. N. JORISSEN, D. MOURADOV, M. CHRISTIE, et al. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res*, Jan 15 2013, 73(2), 725-735.

GALLUZZI, L., F. PIETROCOLA, J. M. BRAVO-SAN PEDRO, R. K. AMARAVADI, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*, Apr 1 2015, 34(7), 856-880.

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.

GEORGAKOPOULOU, E. A., K. TSIMARATOU, K. EVANGELOU, P. J. FERNANDEZ MARCOS, et al. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging (Albany NY)*, Jan 2013, 5(1), 37-50.

GORGOULIS, V. G. AND T. D. HALAZONETIS Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol*, Dec 2010, 22(6), 816-827.

GREEN, D. R. AND F. LLAMBI Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Dec 01 2015, 7(12).

GUINNEY, J., R. DIENSTMANN, X. WANG, A. DE REYNIES, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, Nov 2015, 21(11), 1350-1356.



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.

HAHN, K. K., J. J. WOLFF AND J. M. KOLESAR Pharmacogenetics and irinotecan therapy. *Am J Health Syst Pharm*, Nov 15 2006, 63(22), 2211-2217.

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.

HANAHAN, D. AND R. A. WEINBERG The hallmarks of cancer. *Cell*, Jan 07 2000, 100(1), 57-70.

HANAHAN, D. AND R. A. WEINBERG Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, Mar 04 2011, 144(5), 646-674.

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.

HAYFLICK, L. AND P. S. MOORHEAD The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, Dec 1961, 25, 585-621.

HE, T. C., A. B. SPARKS, C. RAGO, H. HERMEKING, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, Sep 4 1998, 281(5382), 1509-1512.

HITOMI, J., D. E. CHRISTOFFERSON, A. NG, J. YAO, et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, Dec 26 2008, 135(7), 1311-1323.

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., W. T. KUO, Y. C. HUANG, T. C. LEE, et al. Resistance to hypoxia-induced necroptosis is conferred by glycolytic pyruvate scavenging of mitochondrial superoxide in colorectal cancer cells. *Cell Death Dis*, May 2 2013, 4, e622.

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.

HUANG, W. P. AND D. J. KLIONSKY Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct*, Dec 2002, 27(6), 409-420.

CHABOT, G. G. Clinical pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Pharmacokinet*, Oct 1997, 33(4), 245-259.

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.

CHENG, Y., X. REN, W. N. HAIT AND J. M. YANG Therapeutic targeting of autophagy in disease: biology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 2013, 65(4), 1162-1197.

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.

CHO, D., S. SIGNORETTI, M. REGAN, J. W. MIER, et al. The role of mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of advanced renal cancer. *Clin Cancer Res*, Jan 15 2007, 13(2 Pt 2), 758s-763s.

IACOPETTA, B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat*, Mar 2003, 21(3), 271-276.

IYER, S. V., A. PARRALES, P. BEGANI, A. NARKAR, et al. Allele-specific silencing of mutant p53 attenuates dominant-negative and gain-of-function activities. *Oncotarget*, Feb 2 2016, 7(5), 5401-5415.

KALRA, A. V., J. KIM, S. G. KLINZ, N. PAZ, et al. Preclinical activity of nanoliposomal irinotecan is governed by tumor deposition and intratumor prodrug conversion. *Cancer Res*, Dec 01 2014, 74(23), 7003-7013.

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.

KAUR, A. AND S. SHARMA Mammalian target of rapamycin (mTOR) as a potential therapeutic target in various diseases. *Inflammopharmacology*, Jun 2017, 25(3), 293-312.

KAWAKAMI, H., A. ZANAN AND F. A. SINICROPE Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol*, Jul 2015, 16(7), 30.

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.

KOSTIC, A. D., E. CHUN, L. ROBERTSON, J. N. GLICKMAN, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*, Aug 14 2013, 14(2), 207-215.

KOUSTAS, E., M. V. KARAMOUZIS, C. MIHAILIDOU, D. SCHIZAS, et al. Co-targeting of EGFR and autophagy signaling is an emerging treatment strategy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Lett*, Jun 28 2017, 396, 94-102.

KROEMER, G., L. GALLUZZI AND C. BRENNER Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, Jan 2007, 87(1), 99-163.

KROEMER, G., L. GALLUZZI, P. VANDENABEELE, J. ABRAMS, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, Jan 2009, 16(1), 3-11.

KROEMER, G., G. MARINO AND B. LEVINE Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, Oct 22 2010, 40(2), 280-293.

LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, Jul 2 1992, 358(6381), 15-16.

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).

LEVINE, B. AND D. J. KLIONSKY Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, Apr 2004, 6(4), 463-477.

LEVINE, B. AND J. YUAN Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, Oct 2005, 115(10), 2679-2688.

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.

LI, W., J. CHANG, S. WANG, X. LIU, et al. miRNA-99b-5p suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR. *Oncotarget*, Sep 15 2015a, 6(27), 24448-24462.

LI, X., X. MIAO, H. WANG, Z. XU, et al. The tissue dependent interactions between p53 and Bcl-2 in vivo. *Oncotarget*, Nov 3 2015b, 6(34), 35699-35709.

LINDOR, N. M. Lynch syndrome 101 (years, that is). *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2014, 27-32.

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.

LOEB, L. A. Human Cancers Express a Mutator Phenotype: Hypothesis, Origin, and Consequences. *Cancer Res*, Apr 15 2016, 76(8), 2057-2059.

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.

MARINKOVIC, M., M. SPRUNG, M. BULJUBASIC AND I. NOVAK Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018, 8023821.

MARMOL, I., C. SANCHEZ-DE-DIEGO, A. PRADILLA DIESTE, E. CERRADA, et al. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, Jan 19 2017, 18(1).

MATHIJSSSEN, R. H., R. J. VAN ALPHEN, J. VERWEIJ, W. J. LOOS, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res*, Aug 2001, 7(8), 2182-2194.

MATHIJSSSEN, 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.

MCGREGOR, M. J., W. FADHIL, R. WHARTON, Y. YANAGISAWA, et al. Aberrant P53 expression lacks prognostic or predictive significance in colorectal cancer: results from the VICTOR trial. *Anticancer Res*, Mar 2015, 35(3), 1641-1645.

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

MERINO, D. AND D. MALKIN p53 and hereditary cancer. *Subcell Biochem*, 2014, 85, 1-16.

MIZUSHIMA, N. AND M. KOMATSU Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, Nov 11 2011, 147(4), 728-741.

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

MORKEL, M., P. RIEMER, H. BLAKER AND C. SERS Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget*, Aug 28 2015, 6(25), 20785-20800.

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.

NISHIDA, Y., S. ARAKAWA, K. FUJITANI, H. YAMAGUCHI, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, Oct 1 2009, 461(7264), 654-658.

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.

NOEL, M. S. Biologics in bowel cancer. *J Gastrointest Oncol*, Jun 2017, 8(3), 449-456.

OUYANG, L., Z. SHI, S. ZHAO, F. T. WANG, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, Dec 2012, 45(6), 487-498.

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.

PAPADATOS-PASTOS, D., R. RABBIE, P. ROSS AND D. SARKER The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, Apr 2015, 94(1), 18-30.

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.

PAULIK, A., J. GRIM AND S. FILIP Predictors of irinotecan toxicity and efficacy in treatment of metastatic colorectal cancer. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2012, 55(4), 153-159.

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.

PHIPPS, A. I., J. R. ROBINSON, P. T. CAMPBELL, A. K. WIN, et al. Prediagnostic alcohol consumption and colorectal cancer survival: The Colon Cancer Family Registry. *Cancer*, May 15 2017, 123(6), 1035-1043.

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.

QIU, Y., H. YU, X. SHI, K. XU, et al. microRNA-497 inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells by targeting vascular endothelial growth factor-A. *Cell Prolif*, Feb 2016, 49(1), 69-78.

RAMEŠ, J., V. BENCKO AND Z. VALENTA Rizikové faktory prostředí a životního stylu u kolorektálního karcinomu. *Dotazníkové šetření. Hygiena*, 2007, 52(3), 87-88.

RENNOLL, S. AND G. YOCHUM Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer. *World J Biol Chem*, Nov 26 2015, 6(4), 290-300.

RIAZ, A. A., M. X. WAN, T. SCHAFER, P. DAWSON, et al. Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte-endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia-reperfusion. *Br J Surg*, Dec 2002, 89(12), 1572-1580.

RIEDERER, M. A., T. SOLDATI, A. D. SHAPIRO, J. LIN, et al. Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J Cell Biol*, May 1994, 125(3), 573-582.

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.

RUSSO, A., V. BAZAN, B. IACOPETTA, D. KERR, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*, Oct 20 2005, 23(30), 7518-7528.

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.

SAMUELS, Y. AND K. ERICSON Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol*, Jan 2006, 18(1), 77-82.

SANZ-GARCIA, E., G. ARGILES, E. ELEZ AND J. TABERNERO BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. *Ann Oncol*, Nov 1 2017, 28(11), 2648-2657.

SEHDEV, A. AND B. H. O'NEIL The Role of Aspirin, Vitamin D, Exercise, Diet, Statins, and Metformin in the Prevention and Treatment of Colorectal Cancer. *Curr Treat Options Oncol*, Sep 2015, 16(9), 43.

SIMONS, C. C., L. A. HUGHES, K. M. SMITS, C. A. KHALID-DE BAKKER, et al. A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis. *Ann Oncol*, Aug 2013, 24(8), 2048-2056.

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.

SOLOMON, H., N. DINOWITZ, I. S. PATERAS, T. COOKS, et al. Mutant p53 gain of function underlies high expression levels of colorectal cancer stem cells markers. *Oncogene*, Jan 18 2018.

STAMBOLIC, V., D. MACPHERSON, D. SAS, Y. LIN, et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, Aug 2001, 8(2), 317-325.

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.

TSUJIMOTO, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, Nov 1998, 3(11), 697-707.

TSUJIMOTO, Y. AND S. SHIMIZU Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*, Nov 2005, 12 Suppl 2, 1528-1534.

VAN KRIEKEN, J. H., E. ROULEAU, M. J. LIGTENBERG, N. NORMANNO, et al. RAS testing in metastatic colorectal cancer: advances in Europe. *Virchows Arch*, Apr 2016, 468(4), 383-396.

VANDENABEELE, P., W. DECLERCQ, F. VAN HERREWEGHE AND T. VANDEN BERGHE The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal*, Mar 30 2010, 3(115), re4.

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.

VYZULA, R. E. A. *Modrá kniha České onkologické společnosti*. Edition ed.: Masarykův onkologický ústav, Brno, 2017. ISBN 978-80-86793-42-9.

WALDMAN, T., K. W. KINZLER AND B. VOGELSTEIN p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, Nov 15 1995, 55(22), 5187-5190.

WALL, M. E. AND M. C. WANI Camptothecin. Discovery to clinic. *Ann N Y Acad Sci*, Dec 13 1996, 803, 1-12.

WAN, Y. C., T. LI, Y. D. HAN, H. Y. ZHANG, et al. MicroRNA-155 enhances the activation of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal carcinoma by suppressing HMG-box transcription factor 1. *Mol Med Rep*, Mar 2016, 13(3), 2221-2228.

WEN, X., Z. Q. LIN, B. LIU AND Y. Q. WEI Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, Jun 2012, 45(3), 217-224.

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.

YAMAKUCHI, M., M. FERLITO AND C. J. LOWENSTEIN miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Sep 9 2008, 105(36), 13421-13426.

YANG, L., J. FANG AND J. CHEN Tumor cell senescence response produces aggressive variants. *Cell Death Discov*, 2017, 3, 17049.

YANG, Z., R. A. GHOORUN, X. FAN, P. WU, et al. High expression of Beclin-1 predicts favorable prognosis for patients with colorectal cancer. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, Feb 2015, 39(1), 98-106.

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.

YOULE, R. J. AND D. P. NARENDRA Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Jan 2011, 12(1), 9-14.

YU, L. C., A. N. FLYNN, J. R. TURNER AND A. G. BURET SGLT-1-mediated glucose uptake protects intestinal epithelial cells against LPS-induced apoptosis and barrier defects: a novel cellular rescue mechanism? *FASEB J*, Nov 2005, 19(13), 1822-1835.

ZHANG, M. Y., W. F. GOU, S. ZHAO, X. Y. MAO, et al. Beclin 1 expression is closely linked to colorectal carcinogenesis and distant metastasis of colorectal carcinoma. *Int J Mol Sci*, Aug 18 2014, 15(8), 14372-14385.

ZHANG, W., Q. LI, C. SONG AND L. LAO Knockdown of autophagy-related protein 6, Beclin-1, decreases cell growth, invasion, and metastasis and has a positive effect on chemotherapy-induced cytotoxicity in osteosarcoma cells. *Tumour Biol*, Apr 2015, 36(4), 2531-2539.

ZOU, H., W. J. HENZEL, X. LIU, A. LUTSCHG, et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, Aug 08 1997, 90(3), 405-413.