

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



**Bc. Iva Valentová**

**mTOR zprostředkovaná fosforylace Akt na Ser473 reguluje přežívání  
nádorových buněk po ošetření vysokou teplotou PTEN koordinovaným způsobem**

mTOR mediated phosphorylation of Akt at Ser473 regulates cancer cell survival  
after severe hypertermia in PTEN-coordinated manner

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Sadílková, Ph. D.

Praha, 2016

### **Prohlášení**

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

V Praze, 2. května 2016

Podpis:.....

Mé poděkování patří školitelce RNDr. Lence Sadílkové, Ph.D. za veškerý čas, trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi v průběhu diplomové práce věnovala. Dále bych ráda poděkovala svému konzultantovi prof. MUDr. Radku Špiškovi, Ph.D. a celému kolektivu výzkumného oddělení společnosti Sotio, a. s. za ochotu a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

## Abstrakt

Hypertermie (HT), označení používané pro teploty přesahující horní mez fyziologického teplotního rozmezí – 42 °C – vyvolává v závislosti na intenzitě, délce trvání a typu cílové tkáně (tzv. termální dávka) různou míru stresové odpovědi. Aplikace stresového podnětu *in vitro* vede ke změnám v homeostázi vápníku, permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c s následnou aktivací kaspáz vedoucí až ke smrti zasažené buňky. Paralelně dochází k postupnému rozvoji stresové odpovědi na přítomnost denaturovaných proteinů v cytosolu, doprovázené nabohacením a zvýšenou aktivitou molekulárních chaperonů, zvýšením rychlosti proteosomální degradace a vyšší aktivitou autofagického aparátu s postupným útlumem translace, iniciací oprav DNA a aktivací obranných mechanismů přežití. Tento složitý mechanismus odpovědi na stresový podnět je regulován zejména signalizací v ose PI3K/Akt/mTOR. Přežití buněk je v konečném důsledku závislé na energetických rezervách, množství denaturovaných proteinů v cytosolu a míře nevratného poškození DNA. Pokud je termální dávka příliš vysoká, dochází nezvratně ke smrti buňky.

Hypertermie je rovněž jedním ze schválených přístupů v léčbě některých nádorových onemocnění. Pro zvýšení výsledného protinádorového účinku je aplikace hypertermie kombinována s podáváním nízkomolekulárních inhibitorů již zmíněné signalizace řízené PI3K/Akt/mTOR. Přesto ani v kombinaci s hypertermií, ani pokud jsou inhibitory uvedených drah používány samostatně, není často dosaženo očekávaného výsledku terapie. Toto je pravděpodobně zapříčiněno zvýšenou bazální hladinou PI3K u řady nádorů, což má za následek nemožnost dosažení účinné terapeutické dávky použitých inhibitorů bez vyvolání toxického efektu na buňky ve zdravé tkáni. Spolu s dalšími nezanedbatelnými individuálními rozdíly mezi pacienty jsou tyto poznatky pravděpodobně hlavními důvody neúspěchů protinádorové terapie založené na inhibici PI3K/Akt/mTOR.

Na základě výsledků dosažených v rámci předkládané diplomové práce bylo zjištěno, že částečná inhibice aktivity PI3K a jejích efektorů vede za specifických podmínek ke zvýšení dlouhodobého přežívání některých typů nádorových buněčných linií po ošetření hypertermií. Nedostatečná inhibice má za následek aktivaci cytoprotektivních mechanismů regulovaných molekulou přirozeného inhibitoru PI3K (PTEN, Phosphatase-tensin homologue on chromosome 10).

## Abstrakt

Inhibice signalizace v ose PI3K/Akt/mTOR se však stále jeví jako cíl se značným terapeutickým potenciálem v léčbě rakoviny a hlubší porozumění molekulární podstatě její regulace má tedy esenciální význam.

Klíčová slova: hypertermie, chemoterapie, kombinovaná terapie, nízkomolekulární inhibitor, nádorové onemocnění, PI3 kináza, PTEN.

## Abstract

Hyperthermia (HT), a term used in general for temperatures higher than 42°C, induces cell stress response in dependence on its intensity, heating duration and target cell type (this is called a thermal dose). *In vitro*, HT causes changes in Ca<sup>2+</sup> homeostasis as a consequence of endoplasmic reticulum stress and permeabilisation of the outer mitochondrial membrane. The release of cytochrom c further leads to activation of caspases that can result in cell death.

In parallel, the presence of denatured proteins in the cell cytosol leads to the development of the so called unfolded protein response (UPR). UPR is characterized by increased expression and activation of molecular chaperones, increase in the intensity of proteosomal degradation and enhancement in autophagy. This process is accompanied by the attenuation of translation machinery, initiation of DNA repair and activation of cytoprotective mechanisms leading to cell survival. This highly complex stress response mechanism is regulated mainly by the signalling pathways in the PI3K/Akt/mTOR axis. Cell survival is in the end fully dependent on the amount of energetic substrates, denatured proteins accumulation and on the level of irreversibly damaged DNA. If the thermal dose is too high, the cell will ultimately die.

Hyperthermia is also one of the approved approaches in the therapy of some types of cancer. To further enhance the anti-tumor effect, hyperthermia is combined to administration of small molecule based inhibitors of the aforementioned PI3K/Akt/mTOR signalling pathways. However, nor in combination to hyperthermia, nor when administered alone, using these inhibitors lead to the expected therapeutic effects so far. This is probably caused by the increased basal levels of PI3K in many tumor tissues which then causes the inability to reach the effective therapeutic dose without causing toxicity to the healthy tissue. Together with the other non-negligible differences between individual patients, these observations are the most important reasons for the loss of success in the therapy of cancer based on the inhibition of PI3K.

Based of the results reached in this diploma thesis, it was shown that partial inhibition of the PI3K activity and its downstream effector molecules leads under specific conditions to the increased survival rate of some of the tumor cell lines treated with HT. Insufficient inhibition then leads to the activation of cytoprotective

## Abstract

mechanisms regulated by the molecule of the natural PI3K inhibitor (PTEN, Phosphatase- tensin homologue on the chromosome 10).

The inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signalling remains however one of the approaches with a significant potential in the therapy of cancer and further understanding the molecular basis of its regulation is therefore of an essential meaning.

Keywords: cancer, combination therapy, hyperthermia, chemotherapy, low-molecular weight inhibitor, PI3 kinase, PTEN.

# Obsah

Abstrakt.....	4
Obsah .....	8
1 Seznam použitých zkratek .....	11
2 Úvod a cíle práce .....	19
3 Literární přehled .....	21
3.1 Terapeutické přístupy v léčbě rakoviny .....	21
3.1.1 Klinické využití hypertermie .....	22
3.1.2 Účinky aplikace hypertermie na nádorové buňky.....	23
3.1.2.1 Termální dávka .....	25
3.1.2.2 Efekty mírné hypertermie .....	25
3.1.2.3 Efekty intenzivní hypertermie.....	25
3.1.2.3.1 Stres endoplazmatického retikula .....	26
3.1.2.3.1.1 Stresová odpověď na přítomnost špatně sbalených proteinů .....	27
3.1.2.3.2 Poškození mitochondrií působením hypertermie.....	28
3.1.2.3.2.1 Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů v nádorových buňkách vlivem hypertermie .....	29
3.1.2.3.3 Indukce autofagie v nádorových buňkách po ošetření intenzivní hypertermií.....	30
3.1.2.3.3.1 Role autofagie v rakovině .....	32
3.1.2.3.4 Buněčná smrt nádorových buněk v důsledku aplikace stresového podnětu .....	33
3.1.2.3.3.1 Nekróza .....	34
3.1.3 Regulační mechanismy přežívání nádorových buněk.....	35
3.1.3.1 Inhibitory PI3K v kombinovaných terapiích .....	38
4 Materiály a metody .....	40



4.1 Materiály .....	40
4.1.1 Přístroje .....	40
4.1.2 Roztoky, chemikálie a komerční soupravy .....	41
4.1.3 Média a roztoky pro tkáňové kultury .....	45
4.1.4 Protilátky .....	46
4.1.5 Použité buněčné linie.....	48
4.2 Metodika .....	48
4.2.1 Práce s buněčnými kulturami .....	48
4.2.1.1 Rozmrazování a trypsinizace buněk .....	48
4.2.1.2 Počítání buněk .....	49
4.2.1.3 Zamražování buněk.....	49
4.2.1.4 Zpracování primárního nádoru.....	49
4.2.2 Postup přidavku inhibitorů, aplikace hypertermie, chemoterapie ...	50
4.2.3 Příprava lyzátů pro Western Blot .....	51
4.2.3.1 Stanovení koncentrace celkového proteinu.....	51
4.2.3.2 Izolace membránové frakce .....	52
4.2.3.3 Buněčná frakcionace .....	53
4.2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	53
4.2.5 Western Blot .....	53
4.2.5.1 Analýza vybraných molekulárních znaků apoptotické buněčné smrti (Human apoptosis array kit, RD systems) .....	54
4.2.6 Analýza průtokovým cytometrem.....	55
4.2.6.1 Stanovení viability buněk pomocí AnnexinV/DAPI barvení .....	57
4.2.6.2 Analýza exprese imunogenních molekul .....	57
4.2.6.3 Barvení fází buněčného cyklu pomocí PI .....	57
4.2.6.4 Stanovení proliferační aktivity (KI67).....	57
4.2.6.5 Analýza intracelulární exprese p53 .....	58

## Obsah

4.2.6.6 Stanovení mitochondriálního potenciálu .....	58
4.2.6.7 Stanovení intracelulární koncentrace vápníku .....	58
4.2.7 Příprava preparátů pro konfokální mikroskopii .....	58
4.2.8 Stanovení intracelulární a extracelulární koncentrace ATP .....	59
4.2.9 Inhibice genové exprese pomocí siRNA.....	59
4.2.10 Klonogenní esej.....	60
4.2.11 Izolace RNA .....	60
4.2.12 Reverzní transkripce.....	61
4.2.13 qPCR .....	61
5 Výsledky .....	63
5.1 Hypertermie vede ke stresové odpovědi zahrnující zvýšenou produkci ROS, únik cytochromu c a nárůst extracelulární hladiny ATP vedoucí k hypoxii a odpovědi na špatně sbalené proteiny .....	63
5.2 Částečná inhibice PI3K aktivity vede ke zvýšenému přežívání nádorových buněk ošetřených hypertermií.....	68
5.3 Hypertermie u nádorových buněk vyvolává aktivaci signalizace přežívání regulovanou přes PI3K/Akt/mTOR dráhu.....	69
5.4. Interakce p53 a PTEN hraje jednu z hlavních rolí v přežívání nádorových linií po hypertermii s částečnou inhibicí PI3K. ....	76
5.5 Termoprotekce po částečné inhibici PI3K má za následek stabilizaci p53 a jeho translokaci z jádra do cytosolu.....	80
5.6 Zachovaná fosforylace Akt na aminokyselinovém zbytku Ser473 zprostředkovaná TORC2 má stěžejní význam pro funkční signalizaci umožňující přežívání nádorových buněk po hypertermii. ....	82
5.7 Částečná inhibice aktivity PI3K může zvýšit přežívání u vybraných plicních nádorových linií rovněž po ošetření cisplatinou .....	83
6 Diskuze .....	87
<b>7 Závěr .....</b>	<b>93</b>
8 Seznam literatury .....	95

## 1 Seznam použitých zkratek

A549	Buněčná linie adenokarcinomu plic
Akt	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
APAF1	Apoptotic protease-activating factor 1
APS	Persíran amonný (Ammonium persulfate)
ATF	Aktivační transkripční faktor (Activating transcription factor)
Atg	Geny zodpovědné za tvorbu autofagozomu (autophagy-related genes)
ATP	Adenosintrifosfát (Adenosintriphosphate)
Bad	Promotor buněčné smrti asociovaný s Bcl-2 (Bcl-2-associated death promoter)
Bak	Pro-apoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2 homologous antagonist/killer)
Bap31	Protein interagující s Bcl-2 (Bcl-2-interacting protein)
Bax	Pro-apoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein)
Bcl-2	Rodina proteinů regulujících apoptózu, odvozený od B-buňky lymfomu 2 (B cell lymphoma/leukemia-2)
Bcl-xL	Anti-apoptotický protein rodiny Bcl-2 (B-cell lymphoma-extra large)
BH3	Bcl-2 homologní doména 3 (Bcl-2 homology domain 3)

## Seznam použitých zkratek

Bid	BH3 interagující doména antagonisty smrti ( <u>B</u> H3 <u>i</u> nteracting- <u>d</u> omain death agonist)
BiP	Chaperon rodiny HSP70 ( <u>B</u> inding <u>i</u> mmunoglobulin <u>p</u> rotein)
BKM-120	Buparlisib, selektivní inhibitor PI3K (blokuje p110 $\alpha/\beta/\delta/\gamma$ )
BSA	Bovinní sérový albumin ( <u>B</u> ovine <u>s</u> erum albumin)
cDNA	Komplementární DNA
cFLIP	<u>F</u> LICE- <u>i</u> like <u>i</u> nhibitory <u>p</u> rotein
cIAP	Buněčný inhibitor apoptózy ( <u>C</u> ellular <u>i</u> nhibitor of <u>a</u> poptosis)
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý ( <u>C</u> arbon di <u>o</u> xide)
CRT	Kalretikulin ( <u>C</u> alreticulin)
DAMP	Molekulární znaky nebezpečí ( <u>D</u> anger <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern)
DAPI	Fluorecenční barva (4',6- <u>D</u> iamidino-2- <u>P</u> henyl <u>i</u> ndole, Dihydrochloride)
dH <sub>2</sub> O	Destilovaná voda ( <u>D</u> estiled <u>h</u> ydrogen <u>o</u> xide)
DISC	Signalizační komplex indukující smrt ( <u>D</u> eath- <u>i</u> nducing <u>s</u> ignaling <u>c</u> omplex)
DMSO	Dimethyl sulfoxid ( <u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> ide)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina ( <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
DTT	Redukční činidlo ( <u>D</u> i <u>t</u> hi <u>o</u> threitol)
EDTA	Ethylenediaminetetraoctová kyselina ( <u>E</u> thylene <u>D</u> iammine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> cid)

## Seznam použitých zkratk

EIF-2 $\alpha$	Eukaryotický iniciační faktor 2 $\alpha$ ( <u>E</u> karyotic <u>i</u> nitiation <u>f</u> actor <u>2</u> <u><math>\alpha</math></u> )
EM43	Ekvivalent délky ohřevu při 43°C (Jednotka termální dávky)
ER	Endoplazmatické retikulum ( <u>E</u> ndoplasmic <u>r</u> eticulum)
Erk1/2	Kináza regulovaná extracelulárním signálem ( <u>E</u> xtracellular signal- <u>r</u> egulated <u>k</u> inase)
EtOH	Etanol ( <u>E</u> thanol)
FADD	FAS-asociovaná doména smrti ( <u>F</u> AS <u>a</u> ssoiated <u>d</u> eath <u>d</u> omain)
FBS	Fetální bovinní sérum ( <u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv ( <u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dmistration)
FIP200	Regulátor autofagie ( <u>F</u> AK family kinase- <u>i</u> nteracting protein of <u>200</u> kDa)
FITC	Derivát fluoresceinu ( <u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocy <u>a</u> te)
FOXO	Traskripční faktor ( <u>F</u> orkhead box class <u>O</u> )
FSC-A	Oblast signálu generovaná předním rozptylem ( <u>F</u> orward <u>s</u> catter <u>a</u> rea)
GDC-0068	Ipatasertib (selektivní pan Akt inhibitor)
GDC-0941	Pictilisib (inhibitor PI3K)
GRP	Chaperonový protein regulující glukózu ( <u>G</u> lucose <u>r</u> egulated protein)
GSK3 $\beta$	Glykogen syntáza kináza 3 $\beta$ ( <u>G</u> lycogen <u>s</u> ynthase <u>k</u> inase 3 beta)

## Seznam použitých zkratek

H460	Velkobuněčný karcinom plic
H522	Nemalobuněčný karcinom plic
HCL	Kyselina chlorovodíková ( <u>H</u> ydrogen <u>ch</u> loride)
Her-2	Receptor-2 pro lidský epidermální růstový faktor ( <u>H</u> uman epidermal growth factor <u>r</u> eceptor- <u>2</u> )
HHP	Vysoký hydrostatický tlak ( <u>H</u> igh <u>h</u> ydrostatic <u>p</u> ressure)
HIF-1 $\alpha$	Faktor indukovaný hypoxií ( <u>H</u> ypoxia-inducible <u>f</u> actor <u>1</u> , <u><math>\alpha</math></u> subunit)
HIFU	Ultrazvuk o vysoké intenzitě ( <u>H</u> igh <u>i</u> ntensity <u>f</u> ocused <u>u</u> ltrasound)
HMGB1	Amphoterin ( <u>H</u> igh- <u>m</u> obility <u>g</u> roup <u>b</u> ox <u>1</u> )
HSF	Faktory tepelného šoku ( <u>H</u> eat <u>s</u> hock <u>f</u> actors)
HSP	Protein teplotního šoku ( <u>H</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein)
HT	Hypertermie ( <u>H</u> yper <u>t</u> hermia)
Chk-1	Kináza kontrolního bodu 1 ( <u>C</u> heckpoint <u>k</u> inase <u>1</u> )
ICD	Imunogenní buněčná smrt ( <u>I</u> mmunogenic <u>c</u> ell <u>d</u> eath)
IRE1 $\alpha$	Senzor stresu endoplazmatického retikula ( <u>I</u> nositol- <u>r</u> equiring <u>e</u> nzyme- <u>1</u> <u><math>\alpha</math></u> )
kDa	Jednotka molekulární hmotnosti ( <u>K</u> ilo <u>d</u> alton)
LAMP	Membránový protein asociovaný s lysosomem ( <u>L</u> ysosomal- <u>a</u> ssoiated <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein)
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LNCap	Adenokarcinom prostaty

## Seznam použitých zkratek

LY294002	Inhibitor PI3K (blokuje PI3K $\alpha/\delta/\beta$ )
MAPKAP1	<u>M</u> APK <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein <u>1</u>
Mdm-2	<u>M</u> ouse <u>d</u> ouble <u>m</u> inute <u>2</u> homolog
MOMP	Permeabilizace vnější mitochondriální membrány ( <u>M</u> itochondrial <u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> ermeabilization)
mTOR	Savčí cíl rapamycinu ( <u>M</u> ammalian <u>t</u> arget <u>o</u> f <u>r</u> apamycin)
NaCl	Chlorid sodný (Sodium chloride)
NFAT3	Nukleární faktor aktivovaných T buněk ( <u>N</u> uclear <u>f</u> actor of <u>a</u> ctivated <u>T</u> -cells 3)
NOXA	Pro-apoptotický protein rodiny Bcl-2 (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)
OV90	Adenokarcinom ovárií
p53	Nádorový supresor
PBS	Fosfáty pufovaný fyziologický roztok ( <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce ( <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PDK1	<u>P</u> yruvate <u>d</u> ehydrogenase <u>k</u> inase <u>1</u>
PERK	Doublestranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase
PFA	Paraformaldehyd
PH	<u>P</u> leckstrin <u>h</u> omology
PI3K	Fosfoinositol-3-kináza ( <u>P</u> hosphoinositide- <u>3</u> - <u>k</u> inase)

## Seznam použitých zkratek

PIDD	Protein obsahující doménu smrti ( <u>p53-induced with a death domain</u> )
PIP2	Fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát ( <u>Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate</u> )
PIP3	Fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát ( <u>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</u> )
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid ( <u>PhenylMethylSulphonyl Fluoride</u> )
PRAS40	Akt substrát bohatý na prolin ( <u>Proline-rich Akt substrate 40 kDa</u> )
PTEN	Homolog fosfatázy a tenzinu (Phosphatase and tensin homolog)
PTPC	<u>Permeability transition pore complex</u>
PUMA	p53 upregulovaný modulátor apoptózy ( <u>p53-upregulated modulator of apoptosis</u> )
Rictor	<u>Rapamycin insensitive companion of mTOR</u>
RIPA	Lyzační pufr
RIPK1	<u>Receptor interacting protein kinase 1</u>
RLT	Lyzační pufr
ROS	Volné radikály ( <u>Reactive oxygen species</u> )
RPMI	Kultivační médium ( <u>Roswell Park Memorial Institute</u> )
RTK	Receptor-tyrosin kináz ( <u>Receptor tyrosine kinase</u> )
SDS	Dodecylsulfát sodný ( <u>Sodium DodecylSulphate</u> )
SK-MES1	Buněčná linie skvamózního karcinomu



## Seznam použitých zkratk

Smac/DIABLO	<u>S</u> econd <u>m</u> itochondria-derived <u>a</u> ctivator of <u>c</u> aspases/ <u>d</u> irect <u>I</u> AP <u>b</u> inding protein with <u>l</u> ow pI
SNARE	SNAP receptor (SNAP ( <u>S</u> oluble <u>N</u> SF <u>A</u> ttachment <u>P</u> rotein) <u>R</u> eceptor)
SSC-A	Oblast signálu generovaná bočním rozptylem ( <u>S</u> ide <u>s</u> catter <u>a</u> rea)
TBS	Tris pufovaný fyziologický roztok ( <u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
TBST	Tris pufovaný fyziologický roztok + Tween20 ( <u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline + <u>T</u> wen20)
TD	Termální dávka ( <u>T</u> hermal <u>d</u> ose)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TMRE	<u>T</u> etramethyl <u>r</u> hodamine
TNF	<u>T</u> umour <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor
TNFR1	<u>T</u> umour <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
TNFRSF1A	Gen kódující tumor nekrotizující faktor
TRADD	<u>T</u> NFR1- <u>a</u> sociovaná <u>d</u> eath <u>d</u> oména
TRIS	Tris pufovaný fyziologický roztok (Tris Buffered Saline)
ULK1	<u>U</u> ncoordinated 51- <u>L</u> ike <u>K</u> inase 1
UPR	Odpověď na špatně sbalené proteiny ( <u>U</u> nfolded <u>p</u> rotein <u>r</u> esponse)
VDAC	Iontový kanál závislý na napětí ( <u>V</u> oltage- <u>d</u> eependent <u>a</u> nion <u>c</u> hannel)
WBH	Celotělová hypertermie ( <u>W</u> hole <u>b</u> ody <u>h</u> yperthermia)
XBP1	Xbox binding protein-1

## Seznam použitých zkratek

XIAP                      Inhibitor apoptózy (X-linked inhibitor of apoptosis)

$\beta$ -ME                      2-Mercaptoethanol

## 2 Úvod a cíle práce

Potřeba nových a účinnějších přístupů v protinádorové terapii stále narůstá a to zejména vzhledem k poměrně značné frekvenci výskytu rezistence vůči dosud používaným léčebným postupům. Do klinické praxe jsou vedle chemoterapie a radioterapie zaváděna více specifická léčiva schopná cíleně ovlivňovat především buňky nádorové tkáně (monoklonální protilátky, toxiny vázané na monoklonální protilátky, nízkomolekulární inhibitory, cytokiny, imunokiny a další). Avšak ani hypertermie, která má své místo v léčbě různých onemocnění již od starověku, není díky relativně nízkým nákladům a jednoduchosti provedení opomíjena (Mocna, 2007).

Hypertermie (mimotělní ohřev) je používána například v kombinaci s chemoterapií, a to zejména pro léčbu nádorů umístěných hluboko v dutině břišní, dále pak jsou *in vivo* aplikovány magnetické partikule injikované přímo do nádorové tkáně a ohřívány radiofrekvenčními vlnami (Thiesen et al., 2008). V neposlední řadě je efektu hypertermie využíváno v léčbě karcinomu prostaty v rámci kombinované terapie s nízkomolekulárními inhibitory fosfatidylinositol 3 kinázy (PI3K, z angl. phosphatidylinositol 3 kinase) a mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin) (Sarker et al., 2009). Všechna výše uvedená léčebná schémata jsou založena na skutečnosti, že aplikací hypertermie je možno vyvolat v nádorových buňkách tzv. imunogenní buněčnou smrt. Ta je definována jako proces, během kterého dochází k uvolnění adenosintrifosfátu (ATP), HMGB1, molekul teplotního šoku (zejména HSP70 a HSP90) do mimobuněčného prostoru a zároveň dochází k postupnému vystavování molekuly kalretikulinu, která funguje jako aktivační signál pro buňky fagocytů. Tím dojde ke „zviditelnění“ nádorové buňky pro jednotlivé komponenty imunitního systému (fagocyty, antigen-prezentující buňky, cytotoxické T lymfocyty...) a k její následné likvidaci (Kepp et al., 2011).

Tato práce je zaměřena na sledování efektu a molekulárních mechanismů ovlivňující přežívání nádorových buněčných linií po opůsobení vybranými nízkomolekulárními inhibitory PI3K/Akt/mTOR regulovaných drah v kombinaci s hypertermií (zkratka Akt je odvozena z angl. RAC-alpha serine/threonine-protein kinase).

## Úvod a cíle práce

Mezi cíle tohoto projektu patří:

1.) Charakterizace signalizačních mechanismů, vedoucích k buněčné smrti, respektive přežívání u nádorových buněčných linií po ošetření hypertermií:

- Analýza aktivace signalizačních drah, ke které dochází v rámci aktivace stresové odpovědi po hypertermii (stanovení hladiny extracelulárního ATP, analýza hladiny vápníku v cytosolu, změny mitochondriálního potenciálu, únik cytochromu c z mitochondrií, amplifikace reaktivních kyslíkových radikálů - ROS) pomocí průtokové cytometrie a western blotové analýzy.
- Popis signalizačních mechanismů přežívání regulovaných PI3K, aktivovaný jako jeden z hlavních záchranných procesů po ošetření hypertermií, včetně aktivace jeho hlavních komponent (PERK, PTEN, p53, mTOR, Akt, Erk1/2, Bad – viz dále) prostřednictvím western blotové analýzy.

2.) Vliv klinicky používaných inhibitorů PI3K/Akt/mTOR regulovaných drah na životnost nádorových buněčných linií ošetřených hypertermií:

- Titrace inhibitorů vybraných signalizačních drah (PI3K, mTOR, Akt) a stanovení životnosti nádorových buněčných linií ošetřených inhibitorem o specifické koncentraci s následnou aplikací hypertermie v předem definovaných časových intervalech.
- Sledování intracelulární lokalizace molekuly PTEN a p53 za pomoci konfokální mikroskopie.
- Analýza efektu klinicky používaného inhibitoru PI3K na buňky izolované z primárního nádoru.

3.) Porovnání míry přežívání mezi jednotlivými nádorovými buněčnými liniemi ošetřenými inhibitory PI3K/Akt/mTOR a hypertermií, respektive chemoterapií.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Terapeutické přístupy v léčbě rakoviny

Nádorové onemocnění je definováno jako abnormalita zahrnující rysy určité populace buněk, mezi které patří například neregulovatelný růst autonomní povahy (neomezený replikační potenciál), rezistence vůči apoptóze, produkce růstových faktorů (zvýšená angiogeneze), schopnost infiltrovat se (prorůstat) do okolí primárního nádoru a zakládat dceřiná ložiska (metastázy). Tato abnormalita vzniká v důsledku poškození DNA, které organismus není schopen napravit. V důsledku tohoto poškození dochází k nestabilitě genomu nádorových buněk, poškození regulace buněčného metabolismu a dalších jevů, které mohou vést k nádorovému bujení (Sudhakar, 2009; Hanahan, 2011).

Základní možností léčby v případě solidních nádorů je chirurgická resekce nádorové tkáně. Operativní odstranění nádorů bývá z preventivních důvodů (zacílení mikrometastáz) rovněž kombinováno s chemoterapeutickou léčbou (Brada et al., 1992). Chemoterapeutický přístup léčby je založen na podávání vysokých dávek cytostatik, jejichž účelem je inhibovat proliferaci nádorových buněk. Jelikož je tato léčba ve své podstatě neselektivní, napadá i zdravé buňky v organismu pacienta, což sebou přináší řadu nežádoucích účinků. Některé druhy cytostatik fungují na principu inhibice proliferace buněk v určité fázi buněčného dělení, proto jsou neustále se dělící nádorové buňky těmito cytostatiky zasaženy více než buňky zdravé. Toxicita chemoterapeutik však může být natolik vysoká, že poškozuje i zdravé buňky nezávisle na jejich proliferační aktivitě (Martins et al., 2009).

Mezi další protinádorovou terapeutickou modalitu lze zařadit radioterapii, tedy aplikaci ionizujícího záření přímo do oblasti novotvaru. Ozářením dochází k indukci apoptotické smrti nádorových buněk (Delaney et al., 2005). Rovněž v důsledku tohoto zákroku však dochází k porušení buněk zdravé tkáně v v bezprostředním okolí nádoru, což je jako v případě chemoterapie zásadním problémem tohoto léčebného přístupu. Radioterapie je taktéž využívána v kombinované léčbě s chemoterapií (Sebag-Montefiore et al., 2009).

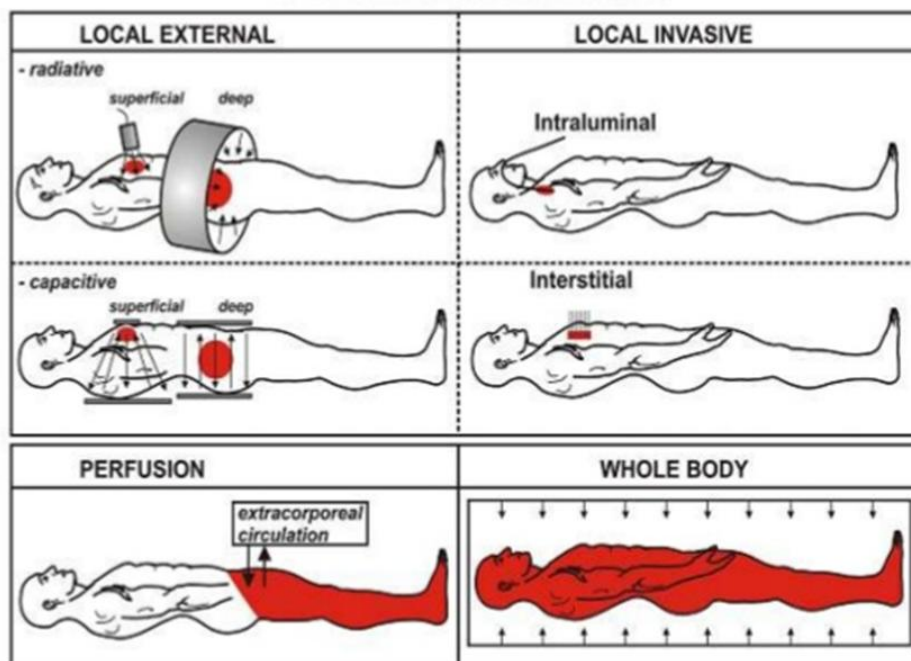
Další léčebnou možností je imunoterapie, která je na rozdíl od chemoterapie a radioterapie založena na aktivaci imunitního systému vedoucí k přirozené eliminaci nádorových buněk. Nádorové buňky mají schopnost stimulovat tvorbu imunopresivního prostředí, což spolu s účelovým snížením hladiny exprese

nádorových antigenů a dalšími mechanismy vede k úniku z tzv. imunitního dohledu (Koido et al., 2013).

V současné době se stále hledají nové možnosti léčby, umožňující léčbu zejména u těch onkologických pacientů, u nichž standardní léčebné postupy selhávají. Stále větší důraz je rovněž kladen na minimalizaci vedlejších účinků léčby a podporu imunitního systému pacienta. Mnoho současných výzkumů je proto založeno na využití některých léčebných technik rozšířených v počátcích léčby nádorových onemocnění ve snaze je zkombinovat s novými terapeutickými přístupy, které vycházejí ze stále se rozšiřujícího porozumění molekulárním mechanismům regulace metabolismu nádorových buněk. Jedním z nejstarších přístupů v léčbě nádorových onemocnění je hypertermie.

### 3.1.1 Klinické využití hypertermie

Klinicky se hypertermie využívá k léčbě solidních nádorů. Dělí se na tři kategorie podle rozsahu a způsobu aplikace. Pro účely úplné ablace nádoru se používají teploty až do 80 °C, aplikace teplot v rozmezí 41 - 45 °C se používá pro dosažení efektů zahrnujících apoptotickou buněčnou smrt, při které nedochází k poškození zdravé tkáně.



Obr. 1: Použité léčebné postupy v aplikaci hypertermie. Klinická hypertermie se dělí podle způsobu aplikace na lokální vnější a lokální invazivní. Mezi lokální vnější techniky patří tzv. povrchová hypertermie, která se používá na nádory uložené v blízkosti povrchu těla a dále pak tzv. hluboká hypertermie, která cílí nádory uložené především v pánevní oblasti za použití mikrovlnných, ultrazvukových nebo radiofrekvenčních aplikátorů. Další možností aplikace hypertermie je využití lokálně invazivních technik, jakými jsou například intraluminální sondy, které působí uvnitř orgánové dutiny

## Literární přehled

pacienta, nebo tzv. intersticiální technika, která je aplikována na velmi hlukoko uložené nádory. Dalším z postupů je využití tzv. regionální perfúze, jejíž podstatou je odběr dílu pacientovi krve, která je ohřáta a následně aplikována zpět do cévního oběhu pacienta. Regionální perfúze se používá nejčastěji na nádory lokalizované v končetinách. Celotělová hypertermie se používá pro eliminaci metastáz a je jí dosaženo po umístění pacienta do tzv. termálních komor. Převzato z: (Van der Zee et al., 2002).

První z těchto kategorií je tzv. celotělová hypertermie (WBH, Whole body hyperthermia, teplotní rozsah 39 – 41 °C), které je využíváno jako systémové terapie při léčbě metastáz. WBH však není díky nízkému rozsahu použitých teplot (minimalizace rizika poškození zdravé tkáně) dostatečně účinná tak, aby zcela nahradila některý z běžně klinicky používaných terapeutických postupů. Na druhou stranu je ale dostatečně účinná, aby zesílila efekt podání cytotoxických léčiv, radiace a dalších zavedených terapeutických metod. V případě WBH se v současnosti nejčastěji využívá účinku tzv. termálních komor. Další kategorií klinické hypertermie je tzv. regionální hypertermie (< 43 °C), aplikovaná nejčastěji do oblasti peritoneální dutiny nebo na končetiny. Regionální hypertermie se používá pro léčbu nádorů uložených hluboko v tkáních, nebo když je zapotřebí zaléčit větší oblast. K technikám používaným pro dosažení regionální hypertermie patří neinvazivní metoda nazývaná HIFU (ultrazvuk o vysoké intenzitě). Do třetí kategorie náleží tzv. lokální hypertermie (43 - 60 °C), jíž se využívá při terapii povrchově lokalizovaných pánevních nádorů, které jsou snadno dosažitelné. Mezi metody, které indukují lokální hypertermii, lze rovněž zařadit vložení kovových sond do nádoru a následné dodávání energie (mikrovlny nebo radiovlny), které preferenčně ukládají vzniklé teplo v kovové sondě a zvyšují tak teplotu uvnitř nádoru. Tato metoda umožňuje rychlé a výrazné zvýšení teploty, které je vhodné též k ablačním účelům (Obr. 1). Dále se používají nanomateriály, které díky rovnoměrné distribuci v oblasti nádoru, zajišťují přesnější kontrolu teploty (Wust et al., 2002; Toraya-Brown et al., 2014; Mallory, 2015; Chicheř et al., 2007; Ahmed et al., 2013).

### 3.1.2 Účinky aplikace hypertermie na nádorové buňky

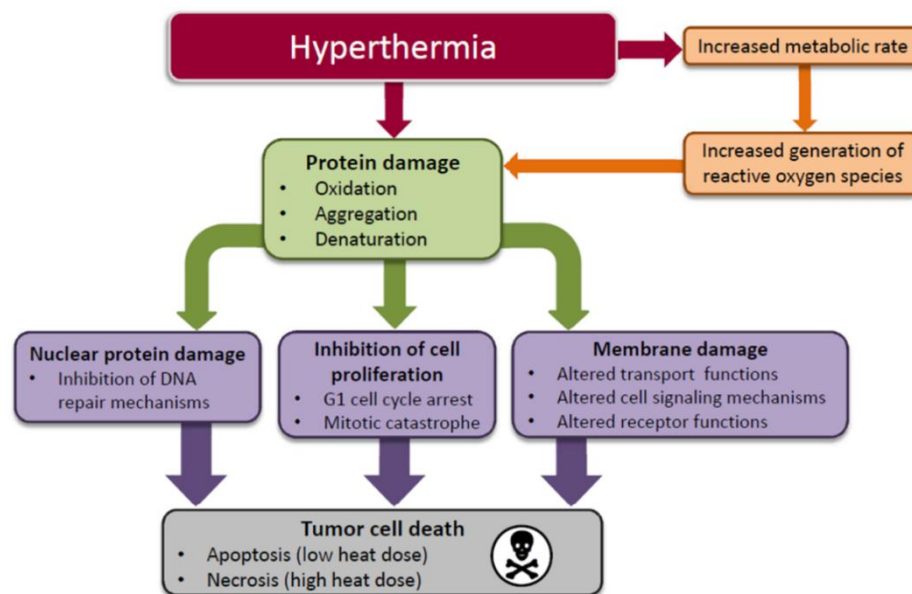
Hypertermie (HT), stimulace imunitního systému navozením zvýšením tělesné teploty, byla používána pro léčbu různých chorob už od Starověku. Jedná se o fyzikální modalitu používanou především v kombinované terapii a její použití je schváleno FDA pro léčbu nádorů lokalizovaných v peritoneální dutině. HT má potenciál zesilovat protinádorové účinky radioterapie a/nebo chemoterapie (Miller, et al., 2013).

Výsledný efekt působení hypertermie je závislý na intenzitě a délce trvání stresového podnětu. Stresová odpověď na aplikovanou hypertermii je komplexní a

## Literární přehled

zahrnuje signalizaci vedoucí k opravám DNA, autofagii, apoptóze, nekróze a dalším reakcím, přičemž citlivost různých buněčných typů se může výrazně lišit (Hildebrandt et al. 2002).

HT rovněž ovlivňuje fluiditu a stabilitu buněčných membrán a má vliv na funkci transmembránového transportu a povrchových buněčných receptorů. Membránové změny představují jeden z důležitých prvků určující směřování buněk ke specifickému typu buněčné smrti. Při dostatečně intenzivním teplotním podnětu také dochází ke změnám membránového potenciálu, zvýšením extracelulární koncentrace sodíku a kalcia, doprovázeného změnou intracelulárního pH. Výsledný efekt aplikované hypertermie je taktéž závislý na fázi buněčného cyklu. Nejvíce citlivé jsou buňky v mitotické fázi (následná neúčinná mitóza) a S fázi (možnost vzniku chromozomálního poškození). Naproti tomu za nejméně citlivé jsou považovány buňky v G1 fázi. Efekty intenzivní HT budou podrobněji popsány v kapitole 3.1.2.3. Podstata mechanismu a rozsah odpovědi nádorových buněk po hypertermii je na molekulární úrovni multifaktoriální a komplexní (viz Obr. 2) a je kritickým způsobem závislá na tzv. termální dávce. (Hildebrandt et al., 2002).



Obr. 2: **Schéma buněčných změn indukovaných hypertermií.** Po aplikaci hypertermie dochází ke zvýšení intenzity buněčného metabolismu, která má za následek rozvoj oxidativní stres v důsledku akumulace reaktivních kyslíkových částic (ROS, z angl. reactive oxygen species). Vlivem oxidace dochází k poškození struktury buněčných proteinů – s postupným rozvojem reakce na přítomnost poškozených a špatně sbalených proteinů (UPR, z angl. unfolded protein response), lipidů a nukleových kyselin – dochází k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi, během které dochází k opravám poškozené DNA. V případě, že se buňce nepodaří poškození opravit, a/nebo jsou ztráty energie příliš rozsáhlé, dochází ke smrti buňky. Převzato z: (Bettaieb et al., 2013).



### **3.1.2.1 Termální dávka**

Ošetření vysokou teplotou je často definováno prostřednictvím tzv. termální dávky (TD), jejíž jednotkou je doba ošetření vyjádřená jako ekvivalent délky ohřevu při 43°C (EM43). Tento koncept poskytuje parametr, který umožňuje porovnání různých ošetření vysokou teplotou, které se mezi sebou liší teplotami a délkami působení. Široce uznávaná formulace TD navrhuje, že pro každé navýšení teploty o 1 °C by měl být použit poloviční čas působení pro dosažení stejné TD (Mouratidis et al., 2015).

Účinek dané termální dávky se liší mezi individuálními nádory a různými typy nádorů. Zdá se, že nejvíce závisí na procentu nádor - zásobujících cév, které umožňují termální regulaci (Hildebrandt et al. 2002).

### **3.1.2.2 Efekty mírné hypertermie**

Působením mírné hypertermie (mHT, z angl. mild hyperthermia), tedy teplot nižších než 43 °C dochází k navýšení koncentrace imunogenních znaků na povrchu nádorových buněk, ke vzniku termotolerance a přechodné aktivaci kaspáz. V konečném důsledku ale převáží záchranné procesy a ve většině nádorových buněk nedochází k iniciaci mechanismů vedoucích nezvratně k jejich smrti (Bettaieb et al., 2015). Krátkodobá hypertermie < 42,5 °C může mít navíc za následek nejdříve vzrůstající procento apoptotických buněk, následované dosažením termální tolerance, která má za následek zvýšení rezistence na další stresové podněty (včetně rezistence vůči radiaci a chemoterapeutická agens) (Bettaieb et al., 2015).

Při mírné hypertermii dochází *in vivo* ke snížení průtoku krve a denzity krevních cév. Tento děj následně vede k hypoxii, acidóze a energické deprivaci (Hildebrandt et al. 2002).

### **3.1.2.3 Efekty intenzivní hypertermie**

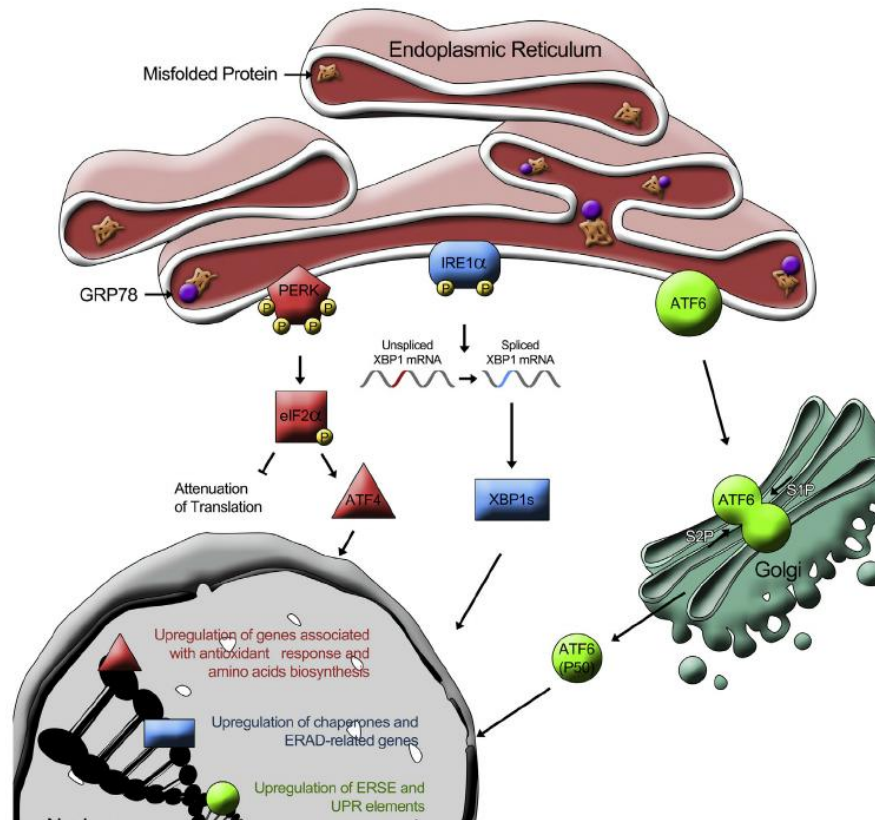
Působení teplot přesahujících 43 °C, označovaných jako tzv. intenzivní hypertermie (sHT, z angl. severe hyperthermia) způsobuje velké množství makromolekulárních změn a ovlivňuje funkce ve všech buněčných kompartmentech. Hypertermie aplikovaná v teplotním rozpětí 43 – 47 °C je obecně doprovázena postupnou exponenciální redukcí v klonogenním přežívání nádorových buněk, stresovou odpovědí na špatné sbalení a agregaci proteinů, jejichž funkce v jádře je kritická pro správný průběh transkripce, replikace a opravy DNA (Roti et al., 2007).

Intenzivní hypertermie indukuje stresovou odpověď endoplazmatického retikula, generaci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), translokaci kalretikulinu, HSP70 a HSP90 na povrch buňky a únik ATP a HMGB1 do extracelulárního prostoru. Tato, tzv. imunogenní buněčná smrt indukovaná intenzivní hypertermií je nezávislá na receptorem - zprostředkované aktivaci kaspázy 8, iniciační kaspáze vnější dráhy apoptózy. Hlavní úlohu hraje aktivace molekuly PERK (z angl. doublestranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase), Bax/Bak proteinů a kaspázy 9, která iniciuje kaskádu vnitřní apoptotické dráhy (Hildebrandt et al. 2002).

### *3.1.2.3.1 Stres endoplazmatického retikula*

Endoplazmatické retikulum je zodpovědné za syntézu proteinů a lipidů, jejich sbalování a posttranslační modifikace. Pokud jsou buňky vystaveny stresovému podnětu (oxidační činidla, hypertermie, léky, mechanické poškození, toxiny nebo infekce) dojde k narušení homeostáze endoplazmatického retikula následované stresovou odpovědí vyvolanou mimo jiné aktivací molekuly PERK. PERK dále fosforyluje EIF-2 $\alpha$  (Eukaryotic initiation factor 2), který inhibuje proteinovou syntézu a zamezuje tak další akumulaci špatně sbalených proteinů. Buňky dále mohou aktivovat rovněž ER asociovanou proteinovou degradaci. Klíčovými regulátory ER stresu jsou chaperonové proteiny GRP78/BiP a GRP94. GRP78 protein má antiapoptotické vlastnosti a dokáže regulovat intenzitu a dopad stresové odpovědi (viz Obr. 3) (Saito, et al., 2011).

Stres endoplazmatického retikula spolu se zvýšenými hladinami ROS může mít za určitých podmínek za následek nárůst extracelulární hladiny imunogenních proteinů, jakými jsou např. tzv. „eat me“ signál molekulárního chaperonu kalretikulinu (CRT) a molekuly tzv. DAMPs (z angl. danger-associated molecular patterns) k nimž náleží HMGB1 (z angl. High mobility group box 1 protein) a rovněž molekuly teplotního šoku (HSP70 a 90). Tyto molekuly se váží na receptory přítomné na povrchu buněk s fagocytární aktivitou. Dochází k pohlcení umírajících nádorových buněk a stimulaci antigenní prezentaci – indukci antigenně-specifické T buněčné odpovědi. Imunogenní buněčná smrt může být v nádorových buňkách vyvolána také působením radiace a vysokým hydrostatickým tlakem (HHP, z angl. high hydrostatic pressure) (Fučíková et al., 2015). Výše popsaný mechanismus je podstatou aktivní buněčné nádorové imunoterapie (Kroemer et al., 2013; Hou et al., 2014).



Obr. 3: **Mechanismus stresové odpovědi endoplazmatického retikula.** Narušení homeostázy endoplazmatického retikula aktivuje senzory stresu asociované s endoplazmatickým retikulem: PERK (PKR-like ER kinase), XBP1 (Xbox binding protein-1) a IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme-1 $\alpha$ ). Tyto stresové senzory jsou udržovány v neaktivním stavu prostřednictvím interakce s GRP78/BIP (78 kDa glucose-regulated protein). Akumulace špatně sbalených proteinů způsobí oddělení GRP78/BIP od těchto proteinů a jejich následnou aktivaci. Aktivovaný PERK fosforyluje EIF-2 $\alpha$ , čímž způsobí snížení syntézy proteinů. EIF-2 $\alpha$  aktivuje ATF4 (activating transcription factor 4), který zprostředkuje biosyntézu aminokyselin. Aktivace IRE1 $\alpha$  vede k nekanonickému sestřihu XBP1, jehož výsledkem je sXBP1 forma, která individuálně, nebo v synergii s ATF6 (activating factor 6) aktivuje transkripcimolekulárních chaperonů. Následně dochází k translokaci aktivovaného ATF6 do jádra, provázené stimulací přepisu z genů obsahujících tzv. ERSE (ER stress response elements) a UPR elementy (např. BiP a CHOP) (Xu et al., 2011). Převzato z: (Plácido et al., 2014).

### 3.1.2.3.1.1 Stresová odpověď na přítomnost špatně sbalených proteinů

Rozvoj stresové odpovědi na špatné sbalení proteinů (UPR, z angl. unfolded protein response) v důsledku sHT je umocněn odhalováním hydrofobních skupin aminokyselinových zbytků a kaskádou agregačních reakcí po kontaktu s již přítomnými špatně sbalenými proteiny. Agregace proteinů ovlivňuje zejména buněčné jádro v důsledku změn proteinů účastnících se tvorby replikační vidličky v procesu DNA replikace. Pozměněná funkce replikační vidličky vede k poškození DNA, jakým je např. dvojvláknový zlom. Zároveň se zvyšuje prostupnost membrány ER, která vede k nárůstu iontů kalcia v cytosolu a změnám mitochondriálního a redox potenciálu (Roti et al., 2007).

### **3.1.2.3.1.2 Proteiny teplotního šoku**

Proteiny teplotního šoku (HSPs, z angl. heat shock proteins) reprezentují heterogenní skupinu molekulárních chaperonů skládající se z pěti podskupin o rozdílných molekulárních hmotnostech (proteiny menší než 40 kDa, HSP60, HSP70, HSP90 a HSP100) a s částečně rozdílnými biologickými funkcemi. Všechny mají chaperonovou funkci, což znamená, že se neselektivně váží na hydrofobní proteinové sekvence uvolněné denaturací. Zabraňují interakci se sousedními agregovanými proteiny, vedoucí k nevratné ztrátě jejich funkce. HSP27 a HSP70 jsou dnes považovány za proteiny s protektivními účinky vůči podnětům vedoucí k buněčné smrti. Některá data předpokládají úzkou souvislost mezi expresí HSPs a inhibicí hypertermické buněčné smrti (Toraya-Brown et al., 2014; Mallory et al., 2015).

### **3.1.2.3.1.3 Molekulární chaperon kalretikulín**

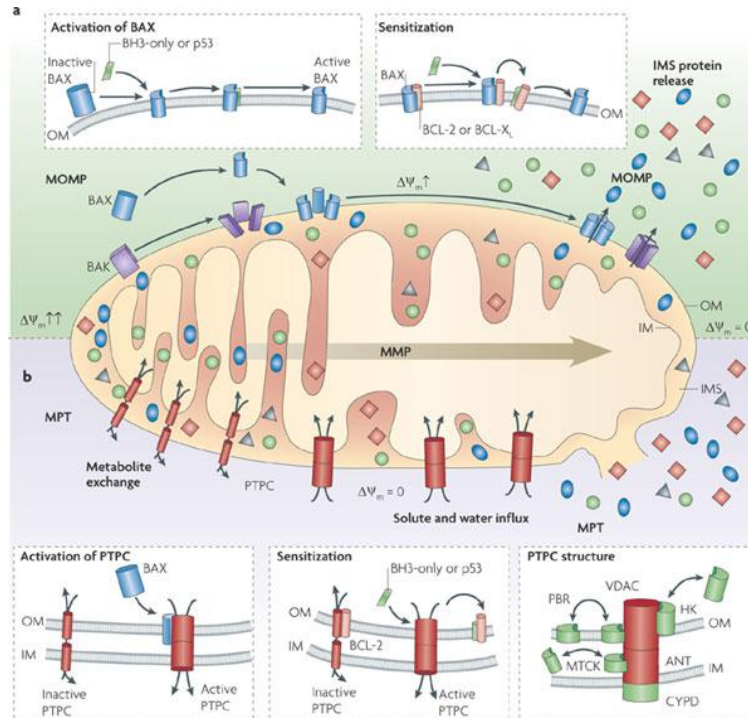
Kalretikulín (CRT) je eukaryotický protein, který je lokalizován v lumen endoplazmatického retikula. CRT vykazuje chaperonovou aktivitu a v interakci s kalnexinem funguje jako regulační protein v homeostázi kalcia. CRT se rovněž účastní regulace jaderného transportu (importu i exportu) NFAT3 a glukokortikoidového receptoru. Změny v expresi CRT zvyšují odpověď buněk na proapoptotické signály.

Bylo považováno za fakt, že defekty v jaderné lokalizaci p53 mohou vést k tvorbě nádoru, zatímco nadměrná produkce p53 *in vivo* (nebo stimulace je tvorby vyvoláním hypoxie) má za výsledek akumulaci proteinu v jádře, indukci zastavení buněčného cyklu a přechod do apoptózy (Mesaeri et al., 2004; Donehower, 1996). V nepřítomnosti CRT dochází k aktivaci přirozeného inhibitoru p53, tzv. Mdm-2 (z angl. mouse double minute 2 homolog) a jeho translokaci do jádra (Fang et al., 2000). V jádře pak Mdm-2 interaguje s p53, oba proteiny jsou exportovány z jádra a degradovány proteasomovou dráhou v cytosolu (Mesaeri et al., 2004).

### **3.1.2.3.2 Poškození mitochondrií působením hypertermie**

Vlivem hypertermie dochází k poškození mitochondrií v důsledku ztráty elektrického potenciálu vnější mitochondriální membrány spojeného s únikem cytochromu c, apoptózu indukujícího faktoru (AIF, z angl. apoptosis inducing factor) a tzv. DIABLO (z angl. inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein) z mitochondrií do cytosolu. Rodina proteinů ze skupiny Bcl je lokalizována v

mitochondriální membráně a reguluje na mitochondriích závislou apoptózu poměrem Bax:Bcl-2 (viz Obr. 4). Hypertermie významně zvyšuje hladiny Bax a redukuje expresi Bcl-2, čímž dochází ke změně poměru Bax:Bcl-2, a následné iniciaci procesů spojených s buněčnou smrtí (Roti et al., 2008; Upreti et al., 2008).



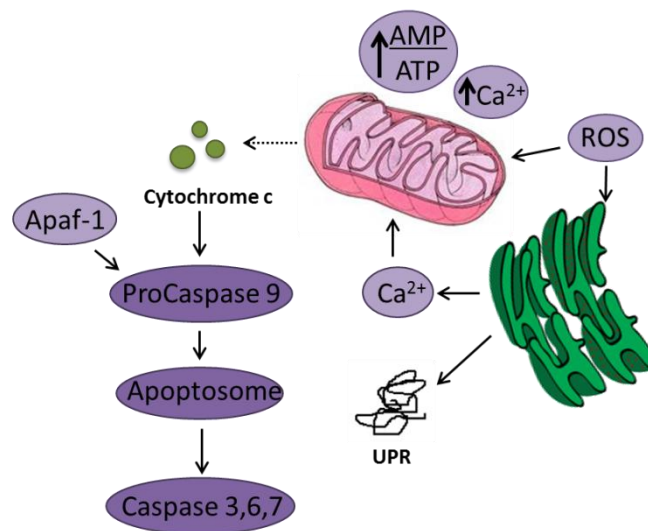
Obr. 4: **Mechanismus permeabilizace vnější mitochondriální membrány (MOMP, z angl. mitochondrial outer membráně permeabilization).** Vlivem porušení membránového potenciálu vnější mitochondriální membrány dochází mimo jiné k úniku cytochromu c. Selektivní zprostředkování MOMP může být způsobeno pro-apoptotickými proteiny Bcl-2 rodiny (například Bax a Bak), které na základě proapoptotické signalizace formují membránové kanály, zvyšující permeabilizaci (a). Další možností je MPT (mitochondrial permeability transition), ke kterému dochází v důsledku zapojení intracelulárně zvýšeného  $Ca^{2+}$  (vlivem stresu endoplazmatického retikula) a oxidativního stresu, který má za následek MMP (z angl. mitochondrial membrane permeabilization) na vnitřní straně mitochondriální membrány, čímž dojde k otevření PTPC (z angl. permeability transition pore complex) (b). Anti-apoptotické proteiny Bcl-2 rodiny (například Bcl-2 a Bcl-xL) přímo inhibují vznik MOMP. Naopak pro-apoptotické proteiny zprostředkovávají MOMP a mohou se rovněž vázat na PTPC části jako je ANT (z angl. adenine nukleotide translocase a VDAC (z angl. voltage dependent anion channel) a napomáhat tak vzniku MPT. BH3-only proteiny spolu s nádorovým supresorem p53 posilují funkci MMP. Některé BH3-only proteiny (například BID) mohou interagovat s Bax a Bak a spustit tak proces formování pórů. Bad je schopen zprostředkovat MMP narušením interakce mezi anti-apoptotickými Bcl-2 proteiny a Bax, Bak nebo PTPC komponenty. Převzato z: (Galluzi et al., 2009).

### 3.1.2.3.2.1 Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů v nádorových buňkách vlivem hypertermie

Při tepelně indukovaném poškození mitochondrií a oxidativním stresu dochází k postupné tvorbě a akumulaci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, z angl. reactive

oxygen species). Kyslíkové radikály mohou destabilizovat proteiny uvnitř jádra, s následným narušením funkce DNA oprav a replikace. Inhibice DNA replikace spojená s tepelně indukovanými defekty v checkpointové signalizaci zapříčiňuje nekompletní DNA replikaci před vstupem do mitózy, což vede k mitotické katastrofě, v důsledku četných chromozomálních aberací (Roti et al., 2007).

Rovněž bylo ukázáno, že ROS mohou fungovat jako signální molekuly, které jsou schopné indukovat proces autofagie a způsobit smrt buňky (Obr. 5) (Badadani et al., 2012).

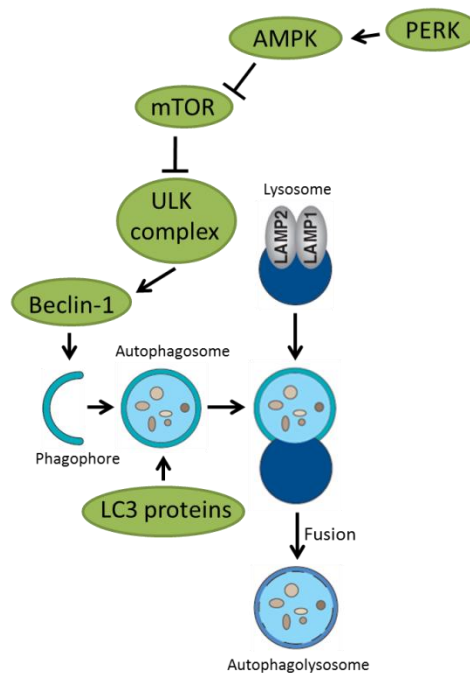


Obr. 5: Aktivace signálních drah po hypertermii. Aplikací intenzivní hypertermie dochází k amplifikaci ROS, zvýšení hladiny intracelulárního vápníku z lumen endoplazmatického retikula, úniku ATP do extracelulárního prostoru, vystavování molekulárních chaperonů (CRT, HSP70, HSP90) na povrch buňky, kolapsu mitochondriálního potenciálu doprovázeném únikem cytochromu c a aktivací kaspáz.

### 3.1.2.3.3 Indukce autofagie v nádorových buňkách po ošetření intenzivní hypertermií

Autofagie je proces, který buňky využívají v odpovědi na stresový podět, a při kterém katabolizují své vlastní nepotřebné, či poškozené komponenty. Existují tři základní typy autofagických procesů. Tato kapitola bude věnována pouze jednomu z nich, a to procesu makroautofagie. V průběhu makroautofagie dochází k formaci dvoumembranového vesiklu, který enkapsuluje poškozené či nepotřebné proteiny a organely a následně splývá s lyzozomy, ve kterých je jejich obsah vlivem působení lyzozomálních enzymů za nízkého pH rozložen. Makroautofagie je tedy rovněž jednou z nedílných komponent mechanismu buněčné signalizace (Mouratidis et al., 2015).

Iniciace formace autofagosomu zahrnuje dva komplexy. Komplex obsahující třídu III PI3K Vps34, Atg6/Beclin1, Atg14, a Vps15/p150.73. Další komplex obsahuje serin threoninovou kinázu Atg1 (Badadani et al., 2012). Autofagie blokuje indukci apoptózy a naopak aktivace kaspáz blokuje autofagický proces. Avšak pokud je stresový podnět příliš silný, pak proteiny zavzaté v procesu autofagie mohou naopak stimulovat indukci apoptózy a/nebo nekrózy, což může vést k tzv. autofagické buněčné smrti (Obr. 6) (Shimizu et al., 2014).



Obr. 6: **Popis signální dráhy makroautofagie.** Iniciace autofagie může nastat důsledkem aktivace různých signálních drah (například aktivací PERK vlivem stresu endoplazmatického retikula. Za hlavního regulátora autofagie je považován mTOR, konkrétně jeho komplex mTORC1 (z angl. mammalian target of rapamycin complex 1, kap. 3.1.3). V případě výskytu dějů, které mohou vyústit v autofagii (nutriční deprivace) dochází k inaktivaci komplexu mTORC1 (který v aktivní formě inhibuje vznik autofagie) a k následné aktivaci ULK komplexu (ULK1-Atg13-Atg101-FIP200) (ULK1, z angl. uncoordinated 51-Like Kinase 1; Atg - autophagy related genes; FIP200 - focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa). Aktivní ULK komplex umožňuje translokaci komplexu k produkci PI3P (fosfatidylinositol-3-fosfátu), který je důležitý pro formování izolační membrány (fagoforu). Produkci PI3P zajišťuje komplex Beclin1, který je lokalizován na fagoforu, kam jsou přitahovány další Atg proteiny (Pyo et al., 2012). Pro expanzi a následné dokončení tvorby charakteristické dvoumembránové struktury autofagosomu jsou potřebné LC3 proteiny. Lipidovaná forma LC3, nazývaná LC3-II, je pak připojována na obě strany autofagosomové membrány, kde hraje roli v jejím prodlužování a uzavírání (Yang and Klionsky, 2010). Posledním krokem vznik autofagolysozomu, při kterém dochází k fúzi vnější membrány autofagosomu s lysozomem, na jehož membráně je navázán LAMP1 a 2 (z angl. lysosome-associated membrane protein 1 and 2), který reguluje splývání lysozomu s autofagosomem. Následuje degradace vnitřní membrány autofagosomu včetně jeho vnitřního obsahu lysozomálními hydrolázami. Výsledné malé molekuly jsou vypuštěny zpět do cytosolu, kde přechodně zvýší dostupné množství živin a tím zvýší aktivitu mTOR brzdícího autofagii (Yu et al., 2010). Celý proces je řízen mnoha produkty



genů Atg. Převzato a upraveno podle:  
<http://media.cellsignal.com/www/pdfs/science/pathways/Autophagy.pdf>.

Během procesu autofagie dojde k formaci izolační membrány (také nazvané fagofor), nejčastěji v kontaktních místech mezi mitochondrií a endoplazmatickým retikulem. Nicméně plazmatické membrány nebo jiné plazmatické orgány, zahrnující také Golgiho aparát, mohou obsahovat přídatné membránové zdroje pro generaci autofagosomů. Autofagie zahrnuje prostorově a časově koordinovanou aktivaci četných molekulárních komponent, zahrnující ULK1, Atg13, Atg101 komplex, který je funkčně spojen s negativním autofagickým regulátorem, mTOR complex 1 (mTORC1). VPS34 (z angl. vacuolar protein sorting 34) a Beclin 1 komplex jsou obvykle inaktivovány anti-apoptotickými proteiny Bcl-2 rodiny a dalšími signalizačními složkami. Dva transmembránové proteiny, Atg9, a VMP1 (z angl. vacuole membrane protein 1) se účastní přijímání/získávání lipidů do izolační membrány. Vlastního procesu formování autofagosomu a následně fagolysosomu se účastní v různých fázích i další proteinové konjugační systémy, jakými jsou Atg12 a proteinový lehký řetězec 3 (LC3, z angl. light chain 3), za účasti proteázy Atg4, která štěpí LC3 na jeho karboxylovém konci, dále pak Atg7 (podobný oběma předešlým konjugačním systémům) a další enzymy Atg10 (z Atg12 systému) a Atg3 (součást LC3 systému), které společně katalyzují kovalentní konjugaci Atg12 k Atg5. Proteiny z rodiny SNARE-podobných proteinů, pak zprostředkují splynutí mezi autofagozomy a lyzozomy v synergii s lyzozomálními enzymy, které pak hydrolyzují proteiny, lipidy a nukleové kyseliny při nízké hladině pH. LC3 zůstává v průběhu celého procesu asociován s autofagozomy a fagolysozomy, což umožňuje mapování jednotlivých kroků výše popsaného procesu (viz Obr. 6) (Marino et al., 2014).

### *3.1.2.3.3.1 Role autofagie v rakovině*

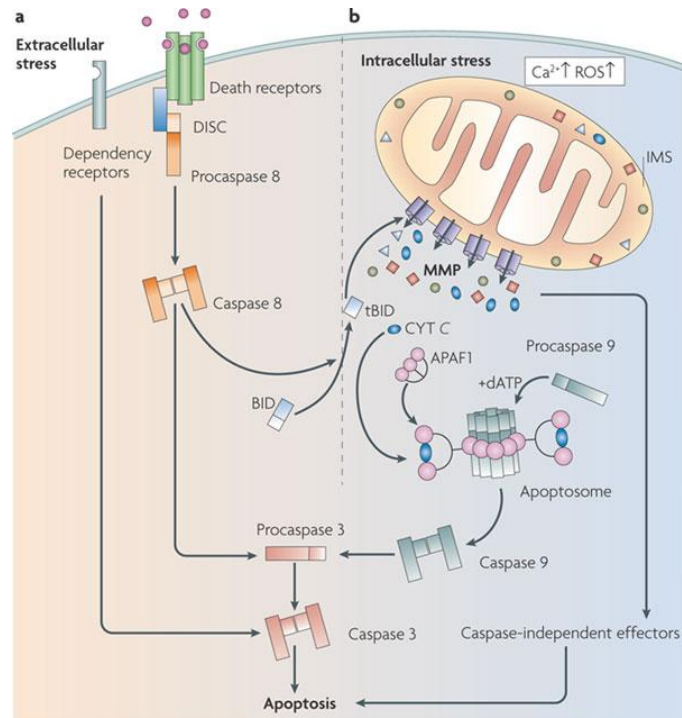
Některé výzkumy se přiklání k názoru, že autofagie přispívá ke schopnosti organismu potlačit vznik nádoru (Mathew et al., 2007). Jiné studie poukazují na fakt, že autofagie vznik nádoru naopak zvyšuje a ochraňuje nádorové buňky před buněčnou smrtí (Degenhardt et al., 2006). Faktem je, že autofagie může i nemusí přispívat k rozvoji rakoviny. Autofagie umožňuje buňce odpovídat na měnící se podmínky okolního prostředí, jako je například nedostatek živin. Během hladovění je autofagie zvýšena, dovoluje buňce degradovat proteiny a orgány, a tím získávat zdroj makromolekulárních prekurzorů, jako jsou aminokyseliny, mastné kyseliny a



nukleotidy. V případě nádorových buněk to může znamenat, že autofagie udržuje buňku naživu, když omezená angiogeneze zapříčiňuje nedostatečný přísun živin a hypoxii. Dalo by se tedy očekávat, že zvýšená autofagie podpoří růst solidních nádorů, zatímco snížená autofagie by mohla představovat užitečný způsob, jak limitovat růst nádoru. Avšak mechanismus, jakým autofagie inhibuje rozvoj nádoru je stále nejasný. Mezi jedny z nejdůležitějších induktorů autofagie patří proteiny p53 a PTEN (viz kap. 3.1.3) patřící však rovněž k jedněm z nejčastěji mutovaných nádorové supresorových genů. Naproti tomu, proteiny rodiny Bcl-2 přímo interagují s Beclin1 a působí inhibiči autofagie (Badadani et al., 2012; Kroemer et al., 2010; Marino et al., 2014). Ovlivnění buněčné signalizace na úrovni regulace těchto proteinů by tedy mohlo mít značný terapeutický význam.

### *3.1.2.3.4 Buněčná smrt nádorových buněk v důsledku aplikace stresového podnětu*

Buněčná smrt a zejména pak apoptóza je obecně vzato proces, který eliminuje přestárlé, poškozené nebo nechtěné buňky fyziologicky kontrolovaným způsobem. Smrt buňky vyvolaná vnějším stresovým podnětem, jakým může být intenzivní hypertermie či aplikace chemoterapeutik často vykazuje zejména v závislosti na fázi buněčného cyklu, ve kterém se konkrétní nádorová buňka nachází, přechodové rysy se znaky apoptózy, nekrózy, případně mitotické katastrofy. Mezi takové znaky patří například permeabilizace vnější mitochondriální membrány, únik cytochromu c do cytosolu, zvýšení intracelulární koncentrace kalcia, únik naštěpených cytoplazmatických nukleozomů a vystavení fosfatidylserinu na extracelulárním povrchu vnějšího listu cytoplazmatické membrány (Mouratidis et al., 2015; Taylor et al., 2008). Následující obrázek představuje schématické znázornění principu aktivace vnitřní a vnější dráhy apoptózy (viz Obr. 7).



Obr. 7: **Schéma molekulárního mechanismu aktivace apoptózy.** Vnější apoptotická dráha (a) je iniciována transmembránovými receptory smrti (death receptor) přítomnými na plazmatické membráně po navázání jejich ligandů, což vede k asociaci receptoru s adaptorovým protein FADD (z angl. FAS-associated death domain protein) a následně vazbě a aktivaci kaspázy 8. Receptor smrti, FADD a kaspáza 8 spolu dohromady tvoří tzv. DISC komplex (z angl. death-inducing signaling complex) který spouští signalizační kaskádu vedoucí přes aktivaci kaspázy 3 k apoptóze. Vnitřní apoptotická dráha (b) je spuštěna po intracelulárním poškození zahrnujícím permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, tvorbu ROS a nárůst  $Ca^{2+}$  v cytosolu. Permeabilizace mitochondriální membrány je označována jako bod, od kterého dojde nevyhnutelně k apoptóze. Dochází totiž k aktivaci mechanismů závislých i nezávislých na kaspázách, které nakonec způsobí buněčnou smrt. Dochází k uvolnění cytochromu c do cytosolu a jeho následné interakci s APAF1 (z angl. apoptotic protease-activating factor 1), čímž dojde k jeho oligomerizaci a k vytvoření apoptosomu. Vznik tohoto komplexu má za následek následnou aktivaci iniciační kaspázy 9. Propojení mezi vnější a vnitřní dráhou je zprostředkované skrze BH3-only protein Bid, který může aktivovat kaspázu 8. Převzato z: (Galluzi et al., 2009).

### 3.1.2.3.3.1 Nekróza

Nekróza je charakterizována ireverzibilním poškozením buňky, vedoucím k dysfunkci mitochondrií a disrupci cytoplazmatické membrány s následným únikem intracelulárního obsahu z buňky. (Proskuryakov et al., 2003). Podtypem nekrózy je nedávno popsána nekroptóza, která byla popsána jako nový typ neapoptotické programované buněčné smrti (Degterev et al., 2008) Mezi projevy nekroptózy patří zvýšená produkce kyslíkových radikálů (ROS), zvýšená glykolýza, aktivace fosfolipáz nebo indukce lysozomální membránové permeabilizace (Edinger a Thompson, 2004).

K iniciaci nekroptózy dochází podobně jako u apoptózy vazbou ligandu např. TNF (z angl. tumour necrosis faktor) na receptor smrti např. TNFR1 (z angl. Tumour

necrosis factor receptor). Po vytvoření vazby dochází k aktivaci tvorbě komplexu I (TRAF2-TRAF5, TRADD, cIAPs, RIP1), následovanou deubikvitinylací RIPK1 (z angl. receptor interacting protein kinase 1) za účasti proteinu cIAP. Po ubikvitinylaci RIPK1 dochází k připojení dalších proteinů (TRADD, FADD, RIP1, kaspáza 8), formujících komplex II. Postup signalizace je závislý na kaspáze 8, konkrétně na její homodimerizaci, která iniciuje apoptotickou signalizaci. Tento jev může být inhibován proteinem cFLIP (z angl. FLICE-like inhibitory protein), jehož navázání na kaspázu 8 zabrání její dimerizaci a následné inhibici apoptózy (Edinger a Thompson, 2004).

### 3.1.3 Regulační mechanismy přežívání nádorových buněk

PI3K/Akt/mTOR signalizační dráha reguluje mnoho buněčných procesů, mezi jinými i buněčnou proliferaci. Konstitutivní aktivace této dráhy je často přítomná v lidských malignitách a hraje jednu z klíčových rolí v progresi rakoviny. Z tohoto důvodu se inhibice jednotlivých jejích komponent za použití nízkomolekulárních inhibitorů jeví jako jeden ze slibných přístupů v protinádorové terapii (Dancey et al., 2004). Nicméně, vznik rezistencí nebo inhibici provázející aktivace dalších proliferčních signalizačních drah spolu s poměrně malým terapeutickým oknem a vysokou toxicitou pro buňky zdravé tkáně značně limituje protinádorovou účinnost PI3K/Akt/mTOR inhibitorů (Courtney et al., 2010). Detailnější porozumění molekulárním mechanismům regulace mezi PI3K/Akt/mTOR by mohly umožnit zvýšení protinádorového účinku uvedených inhibitorů (Faes et al., 2015).

Rodina PI3K se rozděluje na tři skupiny (třídy), v závislosti na rozdílném způsobu jejich aktivace, substrátové specificity a funkce (Katso et al., 2001; Engelman et al., 2006). K aktivaci PI3K třídy 1 dochází buď prostřednictvím receptor-tyrosin kináz (RTKs, z angl. receptor tyrosine kinase; PI3K1A podtřída) nebo skrze signalizaci přes receptory spojené s G-proteinem (GPCRs, z angl. G-protein coupled receptor; PI3K1B podtřída). Strukturně se PI3K skládají z několika regulačních podjednotek p85 $\alpha$ /p85 $\beta$ /p55 – podtřída 1A, p101/p84/p87 – podtřída 1B, avšak PI3K třídy II nevyžadují přítomnost funkční regulační podjednotky a skládají se ze tří rozdílných isoform p110 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Právě tato podskupina patří mezi historicky nejvíce prostudovanou třídu PI3K. Funkce PI3K třídy 3 (tzv. Vsp proteiny) je významně méně prozkoumána. Jedná se vesměs o proteiny účastníci se regulace vezikulárního transportu (Gulati et al., 2008).

PI3K třídy 2 generují fosfatidylinositol 3 fosfáty (PIP3, z angl. phosphatidylinositol 3 phosphate) na plazmatické membráně, čímž dochází k aktivaci proteinů, které nesou tzv. pleckstrin homology (PH) doménu jako je PDK1 a Akt, kam se PIP3 váží (Thomas et al., 2002). Hladiny PIP3 jsou přísně regulované aktivitou nádorového supresoru PTEN (z angl. phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), který přeměňuje PIP3 zpátky na fosfatidylinositol 4,5 - bisfosfát, a antagonizuje tak účinek PI3K. Translokace PDK1 a Akt k plazmatické membráně vede k interakci obou kináz, a fosforylaci Akt působením PDK1 na aminokyselinovém zbytku Thr308. Plná aktivace Akt dále vyžaduje další fosforylaci na aminokyselinovém zbytku Ser473, která je zprostředkována po aktivaci mTOR prostřednictvím mTORC2 – viz dále (Feng et al., 2004). Akt pak dále fosforyluje velké množství efektorových molekul jako např. Mdm-2, GSK3 $\beta$ , FOXO, Bad, kaspázu 9, p27 a PRAS40, což má nakonec za následek růst buňky její proliferaci (Courtney et al., 2010). Akt rovněž inhibuje iniciaci apoptotické signalizace deaktivací pro-apoptotického proteinu Bad (Datta et al., 1997).

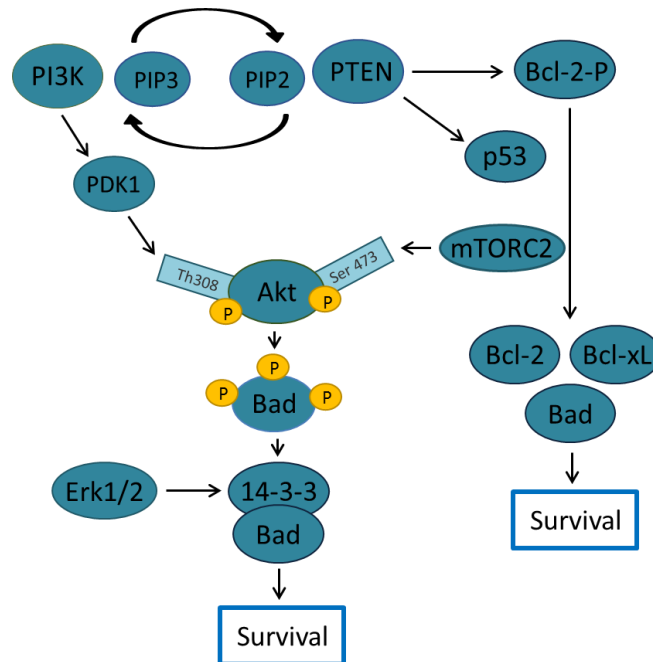
Protein mTOR je serin/threonin kináza skládající se ze dvou komplexů mTORC1 a mTORC2 (Loewith et al., 2002). Komplex mTORC1 obsahuje molekulu Raptor (z angl. regulatory associated protein of mTOR) a G $\beta$ L (z angl.  $\beta$  - subunit G protein like) a komplex mTORC2 obsahuje molekulu Rictor (z angl. rapamycin insensitive companion of mTOR), G $\beta$ L a MAPKAP1 (z angl. MAPK associated protein 1). Právě fosforylace MAPKAP1 vede k deaktivaci mTORC2, což následně vede k inhibici aktivace Akt kinázy touto drahou (Liu et al., 2013). Jak již bylo dříve zmíněno mTORC2 fosforyluje a aktivuje Akt, čímž se mTOR stává zároveň podřazeným i nadřazeným efektem Akt (Sarbasov et al., 2005). Komplex mTORC1 fosforylací negativně ovlivňuje faktory zodpovědné za hladovění, a inhibuje autofagii (Hosokawa et al., 2009).

Hladina PTEN je regulována přímou transkripční aktivitou proteinu p53, jeho funkce může však být na p53 zcela nezávislá a dokonce byla popsána zpětnovazebná regulační smyčka, ve které PTEN přímo ovlivňuje další funkce p53 (Stambolic et al., 2001). Přítomnost PTEN je zároveň důležitá pro správný průběh p53 zprostředkované apoptózy, regulací skrze p53 vazebné místo v oblasti PTEN promotoru. Tento fakt potvrzuje důležitost role proteinu p53 v regulaci buněčného přežívání. Hladina p53 a jeho lokalizace v buňce se výrazně mění (dochází k jeho nabohacení a translokaci do jádra) v důsledku buněčného poškození, které vyústí v zástavu buněčného cyklu,

opravu DNA, nebo v indukci buněčné smrti. p53 indukuje expresi proteinu p21 (inhibitor cyklin dependentních kináz) (Stambolic et al., 2001).

p53 je regulován četnými mechanismy. V klidové buňce je p53 krátkodobě žijící protein (poločas života je pouze 20 minut). Porušení degradačního mechanismu p53 má za následek rychlou akumulaci tohoto proteinu. p53 je degradováno přes ubiquitin-proteazomovou dráhu. Do dneška bylo objeveno 19 E3 ubiquitin ligáz pro p53, ze kterých je Mdm-2 (Mouse double minute 2 homolog) hlavní E3 ligázou. Když Mdm-2 negativně reguluje proteinovou hladinu p53, p53 pozitivně reguluje transkripci Mdm-2. Tohle funguje jako negativní MDM-2-p53 zpětnovazebná smyčka, jejíž funkci je udržovat p53 na nízké hladině v nestresovaných buňkách. Tento negativní zpětnovazebná smyčka je jádrem regulačního odvodu stabilizace p53. Porušení p53-Mdm-2 interakce, například kompeticí nebo posttranslační modifikací, vede k rychlé akumulaci p53 po stresu (Jiang et al., 2010).

Pokud je tato dráha regulace narušena, může se objevit predominance proliferativních znaků vedoucí k maligní transformaci. p53 mutace mají za výsledek onkogenní potenciál, vedoucí ke vzniku genetických změn u lidských solidních nádorů (Obr. 8) (Hildebrandt et al. 2002).



Obr.8: **Mechanismus signalizace PI3K/Akt/mTOR.** Tato dráha reguluje řadu biologických procesů jako například je přežívání, proliferace a růst buněk. K její iniciaci dochází po aktivaci lipidové kinázy PI3K, která generuje PIP3 lokalizovaný na plazmatické membráně. Akt se následně váže na PIP3 skrze PH doménu, čímž dojde k translokaci Akt na plazmatickou membránu. Akt je aktivována prostřednictvím dvou fosforylací. Th308 je fosforylován prostřednictvím PDK1 a Ser473 komplexem mTORC2. Hlavním negativním regulátorem PI3K je PTEN, který defosforyluje PIP3 na jeho neaktivní

formu PIP2 a je u mnoha nádorových onemocnění mutován, což má za následek zvýšenou hladinu přežívání nádorových buněk. Akt dále fosforyluje a inaktivuje několik pro-apoptotických proteinů (například Bad) uvolněním vazebných míst umožňujících vazbu proteinů z rodiny 14-3-3. Převzato z: <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=science-pathways-akt>.

### **3.1.3.1 Inhibitory PI3K v kombinovaných terapiích**

Na základě poznatků uvedených v předcházející kapitole, jsou v současné době klinicky testovány přípravky inhibující aktivitu PI3K (Courtney et al., 2010). Prvním selektivním PI3K inhibitorem schváleným FDA byl idelalisib (GS1101, produkt společnosti Gilead) který inhibuje p110 $\delta$  podjednotku a je testován ve třetí fázi klinických studiích zaměřujících se na léčbu chronické lymfoidní leukémie, malého lymfatického lymfomu a folikulárního lymfomu v kombinaci s rituximabem (FDA approves first PI3K inhibitor Nature Reviews Drug Discovery 13, 644–645 (2014)).

Narozdíl od tzv. první generace inhibitorů PI3K, která zahrnovala např. LY294002, což je kompetitivní inhibitor ATP, který se reverzibilně váže na PI3K (Ohnishi et al., 2006) a wortmannin (C23H24O8), metabolit hub, který značně neselektivně inhibuje aktivitu PI3K ireverzibilní vazbou na všechny podjednotky p110 (shrnuto v Hennessy et al., 2005), se dnes zejména pro vysokou toxicitu výše uvedených přistupuje k testování inhibitorů selektivně se vážajících na pouze jednotlivé podjednotky PI3K p110 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Jedním z dalších neselektivních ač významně více specifických inhibitorů PI3K aktivity je i BKM120 (Buparlisib, produkt společnosti Novartis), blokující p110 $\alpha/\beta/\delta/\gamma$  podjednotky. Tento léčivý přípravek je v současné době testován ve více než 80 klinických studiích a to zejména v kombinaci s podání chemoterapeutik (cisplatina, paklitaxel) v léčbě nemalobuněčných plicních nádorů. Z výsledku klinické studie fáze II, BASALT-1 (Novartis Pharmaceuticals) však zatím není patrný klinický přínos v terapii těchto pacientů. I přes předvýběr provedený ve skupině 1242 pacientů na základě stanovení bazální hladiny PI3K aktivity (13.5 % z celkového počtu vykazovalo konstitutivní aktivaci PI3K), progresse onemocnění byla ve sledovaném 12-ti týdenním intervalu zaznamenána u téměř 80 % pacientů (Vansteenkiste et al., 2015).

Neúspěch je soustavně zaznamenáván i při použití tzv. duálních inhibitorů, kombinujících vlastnosti inhibitorů PI3K a mTOR (PF-04691502 a PF-05212384 – produkty společnosti Pfizer), kde byla například ukončena i klinická studie fáze II u pacientek s relapsující rakovinou endometria pro nedostatek účinnosti aplikovaných inhibitorů (NCT01420081).

## Literární přehled

I přes neustávající úsilí vyvíjet nové inhibitory drah v ose PI3K/Akt/mTOR (např. nyní v klinickém testování: Pictilisib (GDC-0941) - inhibitor PI3K $\alpha/\delta$ ; BEZ235 - duální PI3K/mTOR inhibitor; Ipatasertib (GDC-0068) selektivní pan-Akt inhibitor) další a další sloučeniny v klinických studiích na lidských subjektech napříč různými indikacemi bohužel postupně selhávají - např. XL147, XL765 (produkty společnosti Exelixis/Sanofi-aventis), výše uvedený GDC-0941 (produkt společnosti Genentech), MK-2206 (produkt společnosti Merck) – o to i pokud jsou aplikovány v kombinaci s rutinně používanými chemoterapeutiky.

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Materiály

#### 4.1.1 Přístroje

Tab. 1: Seznam použitých přístrojů

Přístroj	Výrobce
Blotovací systém, Trans-Blot Turbo Transfer Sys.	BioRad, Švýcarsko
CO <sub>2</sub> inkubátor, SteriCycle 371, 184 l	Thermo Fisher Scientific, USA
Cycler, CFX96 Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad	BioRad, Švýcarsko
Cycler, MyCycler 96 x 0,2 ml, Bio-Rad	BioRad, Švýcarsko
Digitální váha KERN EW 602-3NM	KERN, Česká Republika
Elektroforéza, B1 Minigel System, OWL	Thermo Fisher Scientific, USA
Elektroforéza, Criterion Blotter	BioRad, Švýcarsko
Elektroforéza, Mini Trans-Blot Cell	BioRad, Švýcarsko
GBox iChemi XR5	Syngene, UK
Chladnička, Lkv 3910, Liebherr	Liebherr, Německo
Chlazená centrifuga, Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, USA
Konfokální mikroskop LCS SP5	Leica, Německo
Laminární box, HeraSAFE KS 12, Biohazard	Thermo Fisher Scientific, USA
Magnetické míchadlo s ohřevem Heidolph Hei-Standard	Thermo Fisher Scientific, USA
Mikrocentrifuga, Rotilabo mini zentrifuge Uni-fuge	Carl Roth, Německo
Mraznička, GG5210, Liebherr	Liebherr, Německo
Eclipse TS100 LED binokulární mikroskop	Nikon, USA
PCR box, BSUVT-S-AR	Biosan, Lotyšsko
pH Metr 3510	Jenway, UK
Rolovací třepačka, Stuart Roller Mixer SRT6D	Stuart, USA
Single Tube Luminometer FB12	Titertek-Berthold, Německo
Sonikátor Q700	Qsonica, USA
Spektrofotometr, Nanodrop 2000c	Nanodrop, USA
Termomixér, Thermomixer comfort	Sigma Aldrich, USA
Vodní lázeň, TW8 Water bath	Julabo, Německo
Vortex, Grant Bio PV-1	Grant Bio, uk



#### 4.1.2 Roztoky, chemikálie a komerční soupravy

Tab. 2: Seznam použitých chemikálií a komerčních souprav

Chemikálie	Výrobce
10x Permeabilization buffer	eBioscience, USA
10x annexin V binding buffer	BD pharmingen, India
2-mercaptoethanol	Sigma Aldrich, USA
30% acrylamide/Bis solution 29:1	BioRad, Švýcarsko
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, USA
SMARTpool: Accell PTEN siRNA	Dharmacon, USA
Albumin from bovine serum	Sigma Aldrich, USA
Amonium persulfate (APS)	BioRad, Švýcarsko
Annexin V binding buffer 10x	eBioScience, USA
Aqua pro injectione (Miniplasco)	B. Braun Medical
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, USA
CryoStor® CS10	Sigma Aldrich, USA
Dimethyl sulfoxide puriss. p.a.	Sigma Aldrich, USA
DMSO	Sigma Aldrich, USA
Ethanol 96%	Merk Millipore, Německo
Fixation/permeabilization concentrate	eBioScience, USA
Glycerol	Sigma Aldrich, USA
GLYCINE	MP Biomedicals, USA
Hydroxid sodný (NaOH)	Penta, Česká Republika
Chlorid sodný (NaCl)	Penta, Česká Republika
Ionomycin calcium salt from Streptomyces conglobatus	Sigma Aldrich, USA
Krystalová violet 0,5%	Penta, Česká Republika
Collagenase D from Clostridium histolyticum	Sigma Aldrich, USA
DNase I	Sigma Aldrich, USA
Lipofectamine RNAiMAX reagent	Invitrogen, USA
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
Paraformaldehyde	Sigma Aldrich, USA
Permeabilization bufferm 10x	eBioScience, USA
PMSF	MP Biomedicals, USA
Ponceau S solution	Sigma Aldrich, USA
Prestained SDS-PAGE Standards	BioRad, Švýcarsko
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Thermo Fisher Scientific, USA
TEMED	BioRad, Švýcarsko
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride	Sigma Aldrich, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Serva, Německo
Triton X-100	MP Biomedicals, USA
Trypanová modř (0.4%)	Molecular Probes, USA
Tween 20	Promega, USA
Komerční souprava	Výrobce
Apoptosis array kit	R&D Systems, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen, Německo
Cell Surface Protein Isolation kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Cell Fractionation Kit	Cell Signaling, USA

Materiály a metody

**Lyzační pufr pro Western blot - RIPA**

10 mM TRIS pH 7,5

150 mM NaCl

5 mM EDTA, pH 8,0

1% Triton X-100

H<sub>2</sub>O doplnit do 50 ml

- RIPA complete:

+ roztok inhibitorů proteáz (Complete mini, 10x)

+ PMSF (100x)

**5 × Sample buffer pro Western blot**

300 mM Tris pH 6,8

5% SDS

50% glycerol

360 mM (2,5%) β-ME

0,05% bromfenolová modř

dH<sub>2</sub>O doplnit do 40 ml

**10x Proteinový pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu**

Glycin 144,2 g

Tris 30,3 g

Materiály a metody

SDS 10 g

H<sub>2</sub>O doplnit do 1000 ml

**10x Blotovací pufr pro Western blot**

Glycin 144 g

Tris 30 g

H<sub>2</sub>O doplnit do 1000 ml

**1x Blotovací pufr pro Western blot**

10x blotovací pufr 100 ml

Methanol 200 ml

dH<sub>2</sub>O 700 ml

**10x TBS**

NaCl 80 g

TRIS 24,1 g

dH<sub>2</sub>O doplnit do 1000 ml

Upravit hodnotu pH = 7,6 přidavkem 5 M HCl.

**1× TBST**

10x TBS 100 ml

## Materiály a metody

dH<sub>2</sub>O 900 ml

TWEEN 20 1 ml

### **5% zaostřovací gel – rozpis na 2 gely:**

30% akrylamid (0,5 ml)

1M TRIS pH 6,8 (375 µl)

dH<sub>2</sub>O (2,1 ml)

20% SDS (14 µl)

10% APS (22,5 µl)

TEMED (3 µl)

### **12% separační gel – rozpis na 2 gely:**

30% akrylamid (4,48 ml)

1M TRIS pH 8,8 (4,2 ml)

dH<sub>2</sub>O (2,535 ml)

20% SDS (62 µl)

10% APS (56 µl)

TEMED (7,5 µl)

### 4.1.3 Média a roztoky pro tkáňové kultury

Tab. 3: Seznam použitých roztoků pro tkáňové kultury

Média	Výrobce
Cryostor CS10	Gibco, USA
2-mercaptoerhanol	Sigma Aldrich, USA
F-12K NutMix (1X) (Ham's F-12K (Kaighn's) Medium)	Gibco, USA
Fetal Bovine Serum	PAA Cell Culture Company, USA
Glutamax I-CTS	Gibco, USA
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Gibco, USA
PBS	Lonza, Švýcarsko
PBS-EDTA	Lonza, Švýcarsko
Penicillin-Streptomycin Solution	Gibco, USA
RPMI Medium 1640 500ml	Gibco, USA
Trypsin-EDTA (0,25%)	Gibco, USA

Kompletní médium: (RPMI 1640, F12, MEM) + 10 % FBS + 1 % Penicilin-Streptomycin + 1 % Glutamax.

#### 4.1.4 Protilátky

Tab. 4: **Protilátky použité při FACS analýze a konfokální mikroskopii.** Protilátky použité pro extracelulární barvení byly ředěny podle protokolu v PBS roztoku. V případě intracelulárního barvení byly protilátky ředěny do 1× permeabilizačního pufru. Sekundární protilátky byly ředěny v PBS roztoku nebo 1× permeabilizačním pufru v poměru 1:200.

<b>Primární protilátka</b>	<b>Výrobce</b>
Rhodamine Phalloidin	Molecular Probes, USA
Annexin V - 647	Exbio, Česká Republika
Annexin V Binding Buffer	Exbio, Česká Republika
AnnexinV-PE	Exbio, Česká Republika
Anti-Ki67 antibody	Abcam, USA
FITC Mouse Anti-Human CD227	BD Biosciences, USA
PE/Cy7 anti-human CD326 (EpCAM) Antibody	Biologend, UK
Anti-human epithelial antigen FITC antibody	Dako, Dánsko
Anti-Calreticulin antibody	Abcam, USA
Calreticulin rabbit	Cell Signaling, USA
DAPI dilactate	Thermo Fisher Scientific, USA
Fluo-4, AM, cell permeant	Molecular Probes, USA
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate)	Thermo Fisher Scientific, USA
HSP70	RD system, USA
HSP90	Enzo Life Sciences, USA
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Molecular Probes, USA
Propidium iodide	Sigma Aldrich, USA
Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Perchlorate (TMRE)	Thermo Fisher Scientific, USA
<b>Sekundární protilátka</b>	<b>Výrobce</b>
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody	Invitrogen, USA
PE Mouse IgG1, κ isotype Ctrl (FC) Antibody	Biologend, UK
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG2a (γ2a)	Thermo Fisher Scientific, USA
PerCP/Cy5.5 Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	Biologend, UK
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody	Invitrogen, USA
Alexa Fluor 568 Donkey Anti-Rabbit IgG Antibody	Invitrogen, USA
Alexa Fluor 647 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody	Invitrogen, USA
Alexa Fluor 647 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody	Invitrogen, USA

Tab. 5: **Protilátky použité při western blotové analýze.** Protilátky (vše od výrobce Cell Signaling, USA) byly ředěny v 5% odtučněném mléce rozpuštěném v TBST nebo 5% BSA v TBST podle protokolu.

## Materiály a metody

Primární protilátka	Hmotnost	Specifická	Ředění
Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb	60 kDa	Rb	1:1000
AMPK $\alpha$ (D5A2) Rabbit mAb	62 kDa	Rb	1:1000
Anti-Calreticulin antibody	55 kDa	Rb	1:1000
Bad (D24A9) Rabbit mAb	23 kDa	Rb	1:1000
BAP31 Antibody	28 kDa	Rb	1:1000
Bcl-2 (124) Mouse mAb	26 kDa	M	1:1000
Bcl-2 (124) Mouse mAb	26 kDa	M	1:1000
Caspase-3 Antibody	17, 19, 35 kDa	Rb	1:200
Caspase-4 Antibody	45 kDa	Rb	1:1000
Caspase-6 Antibody	15, 35 kDa	Rb	1:200
Caspase-7 Antibody	20, 35 kDa	Rb	1:1000
Caspase-9 (C9) Mouse mAb	47, 37, 35 kDa	M	1:1000
Cyclin D1 Antibody	36 kDa	Rb	1:1000
eIF2 $\alpha$ Antibody	38 kDa	Rb	1:1000
FLIP (D16A8) Rabbit mAb	55 kDa	Rb	1:1000
HER2/ErbB2 Antibody	185 kDa	Rb	1:1000
Chk1 (2G1D5) Mouse mAb	56 kDa	M	1:1000
CHOP (L63F7) Mouse mAb	27 kDa	M	1:1000
IRE1 $\alpha$ (14C10) Rabbit mAb	130 kDa	Rb	1:1000
Lamin A/C Antibody	28, 70 kDa	Rb	1:500
NF- $\kappa$ B1 p105/p50 (D4P4D) Rabbit mAb	50, 120 kDa	Rb	1:1000
Non-phospho PTEN (Ser380/Thr382/Thr383)	55 kDa	Rb	1:1000
p38 MAPK Antibody	43 kDa	Rb	1:1000
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	42, 44 kDa	Rb	1:1000
p53 Antibody	53 kDa	Rb	1:1000
PERK (C33E10) Rabbit mAb	140 kDa	Rb	1:1000
P-Akt (Ser473) (193H12) Rabbit mAb	60 kDa	Rb	1:1000
P-Akt (Thr308) (244F9) Rabbit mAb	60 kDa	Rb	1:1000
P-AMPK $\alpha$ (Thr172) (40H9) Rabbit mAb	62 kDa	Rb	1:1000
P-AMPK $\beta$ 1 (Ser108) Antibody	38 kDa	Rb	1:1000
P-Bad (Ser112) (40A9) Rabbit mAb	23 kDa	Rb	1:1000
P-Bad (Ser136) (D25H8) Rabbit mAb	23 kDa	Rb	1:1000
P-Bad (Ser155) Antibody	23 kDa	Rb	1:1000
P-Bcl-2 (Ser70) (5H2) Rabbit mAb	28 kDa	Rb	1:1000
P-eIF2 $\alpha$ (Ser51) Antibody	38 kDa	Rb	1:1000
P-Chk1 (Ser317) (D12H3) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	56 kDa	Rb	1:1000
P-I $\kappa$ B $\alpha$ (Ser32) (14D4) Rabbit mAb	40 kDa	Rb	1:1000
P-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody	43 kDa	Rb	1:1000
P-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody	42, 44 kDa	Rb	1:1000
P-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody	42, 44 kDa	Rb	1:1000
P-p53 (Ser15) Antibody	53 kDa	Rb	1:1000
P-p53 (Ser20) Antibody	53 kDa	Rb	1:1000
P-PERK (Thr980) (16F8) Rabbit mAb	140 kDa	Rb	1:1000
P-PI3 Kinase p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199) Antibody	60, 85 kDa	Rb	1:1000
P-PTEN (Ser380/Thr382/383) (44A7) Rabbit mAb	54 kDa	Rb	1:1000
P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody	46, 54 kDa	Rb	1:1000
PI3 Kinase p110 $\alpha$ (C73F8) Rabbit mAb	110 kDa	Rb	1:1000
PI3 Kinase p85 Antibody	85 kDa	Rb	1:2000
Purified Mouse Anti-Cytochrome C	15 kDa	Rb	1-2 $\mu$ g/ml
SAPK/JNK Antibody	46, 54 kDa	Rb	1:1000
VDAC Antibody	32 kDa	Rb	1:1000
$\beta$ -Actin (D6A8) Rabbit mAb	45 kDa	Rb	1:1000

#### **4.1.5 Použité buněčné linie**

A549	Adenokarcinom plic
LNCap	Adenokarcinom prostaty
H522	Nemalobuněčný karcinom plic
H460	Velkobuněčný karcinom plic
H596	Adenoskvamózní karcinom plic
SK-MES-1	Skvamózní karcinom plic
OV-90	Adenokarcinom ovárií

### **4.2 Metodika**

#### **4.2.1 Práce s buněčnými kulturami**

Veškerá práce s buněčnými kulturami probíhala v laminárním boxu za použití sterilních roztoků, špiček a pipetovacích nástavců. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.

##### ***4.2.1.1 Rozmrazování a trypsinizace buněk***

Buňky byly vyjmuty z tekutého dusíku, rozmrazeny do tkáňového média a přeneseny do kultivační láhve. Takto nasazené buňky byly pěstovány do 80-90% konfluence. Z narostlých buněk bylo odstraněno médium, buňky byly opláchnuty 10 ml vytemperovaného roztoku PBS+EDTA a inkubovány ve 3 ml roztoku Trypsin+EDTA v CO<sub>2</sub> inkubátoru, dokud se neuvolnily do média. Poté bylo k buňkám přidáno 6 ml kompletního média vhodného pro příslušnou linii a buňky byly důkladně resuspendovány. Suspenze byla centrifugována (1200 rpm, 5 min, 4°C). Sediment buněk byl resuspendován v kompletním médiu, rozdělen do kultivačních láhví (75 cm<sup>2</sup>) a objem doplněn na výsledných 23 ml kompletního média. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.



#### **4.2.1.2 Počítání buněk**

Po dosažení požadované kofluence buněk narostlých v tkáňových láhvích byly buňky trypsinizovány (viz 4.2.1.1) a sediment buněk byl resuspendován v objemu 20 ml příslušného média. Od tohoto objemu bylo poté odebráno 10  $\mu$ l média, ke kterému bylo přidáno 10  $\mu$ l trypanové modři 0,4% (1:1). Buňky byly následně spočítány v Bürkerově komůrce pod světelným mikroskopem. Z plochy komůrky, rozdělené trojitými čarami na 9 čtverců, byl vybrán jeden, který je dále rozdělen na 16 malých čtverců. Byly spočítány buňky uvnitř čtverce a rovněž ty, které se dotýkaly dvou z jeho čtyř stran. Výsledný počet buněk z Bürkerovy komůrky (x) byl dosazen do vzorce, ze kterého bylo vypočteno výsledné množství buněk:

$$x/16/0,004 \times 2 \times 20 \times 1000$$

x = počet částic

16 = počet čtverců

0,004 = hloubka komůrky

2 = 1:1 trypanová modř

20  $\times$  1000 = ředění (20 ml)

#### **4.2.1.3 Zamrazování buněk**

Při zamrazování buněčných linií byly buňky sklizeny z kultivačních lahví (viz 4.2.1.1), spočítány (viz 4.2.1.2) a resuspendovány v 1 ml Cryostoru v koncentraci 5 miliónů buněk/ml a zamraženy při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.1.4 Zpracování primárního nádoru**

Buňky primárního nádoru byly získány ze vzorku pocházejícího z onkologického oddělení fakultní nemocnice Motol (informovaný souhlas byl získán od všech pacientů v rámci studie sledující infiltraci vybraných populací imunitních buněk u pacientů s karcinomem plic). Pro účely zpracování byl nádor přenesen do 6-ti jamkové destičky a rozstříhán na co nejmenší kousky, ke kterým byly následně přidány 4 ml média RPMI 1640, směs byla promíchána a rozpipetována do nové 6-ti jamkové

destičky. Ke směsi nastříhané tkáně se 4 ml média RPMI 1640 bylo přidáno 50  $\mu$ l kolagenázy D (výsledné ředění 100x) + 5  $\mu$ l DNázy I (výsledné ředění 1 000x). Směs buněk v médiu byla kultivována v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> po dobu 30 minut za stálého třepání (viz 4.1.2). Po rozvolnění pojivové tkáně byla směs přenesena na 100  $\mu$ m sterilní filtr a jemným kroužením pístem ze sterilní stříkačky protlačena přes filtr do 50 ml zkumavky (několikrát opakováno s propláchnutím PBS roztokem). Suspenze byla následně centrifugována (1200 rpm, 10 min, 4 °C). Po centrifugaci byl odlit supernatant a peleta byla resuspendována v malém množství PBS s přídavkem FBS do finální koncentrace 2 %. Buňky byly poté spočítány (viz 4.2.1.2) a rozsazeny do nových 6-ti jamkových destiček a kultivovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C do konfluence. Následně byly buňky trypsinizovány (viz 4.2.1.1), spočítány (viz 4.2.1.2) a rozsazeny do 96-jamkové destičky. U takto připravených buněk byl nabarven nádorově specifický antigen EpCam, MUC-1 a lidský epiteliální antigen (viz 4.1.4). Buňky byly následně měřeny na průtokovém cytometru a vyhodnoceny softwarem FlowJO (viz 4.2.6).

Procentuální zisk buněk pozitivních na nádorové antigeny byl však minimální, pravděpodobně z malého množství zpracovaného primárního nádoru. Z toho důvodu jsme se rozhodli nezahrnovat výsledky z toho experimentu do výsledných dat.

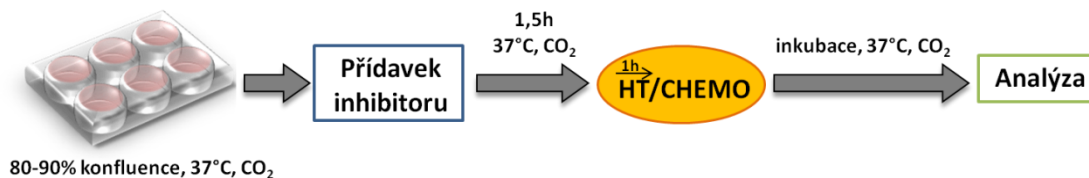
#### 4.2.2 Postup přidavku inhibitorů, aplikace hypertermie, chemoterapie

Buňky o 80-90% konfluenci byly rozsazeny do 6-ti jamkových tkáňových destiček po 250 000 buňkách na jamku a kultivovány přes noc v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly následně ošetřeny přídavkem příslušného inhibitoru (viz tabulka 6) nebo kombinací inhibitorů, nebo byly ponechány bez inhibitoru.

Tab. 6: Seznam použitých inhibitorů.

Inhibitor	Výrobce	Koncentrace ( $\mu$ M)
LY294002	Cell Signaling Technology, USA	20, 30, 40, 50
BKM120 (NVP-BKM120, Buparlisib)	Selleckchem.com, USA	1, 10
Torin 1	Cayman Chemical, USA	0,1 1 10
Z-LEHD-FMK	Cell Signaling Technology, USA	25
Staurosporine from Streptomyces sp.	Sigma Aldrich, USA	1
Thapsigargin	Sigma Aldrich, USA	5
Z-VAD-FMK pan-caspase inhibitor	Enzo Life Sciences, USA	25

Adherentní buňky v destičkách byly inkubovány v přítomnosti inhibitorů po dobu 1,5 hodiny. Takto připravené buňky byly ošetřeny hypertermií nebo chemoterapeutiky (Obr. 9).



Obr. 9: **Schéma experimentu.** Buňky byly napěstovány do 80-90% konfluente v 6-ti jamkové destičce. Následně byl k adherentním buňkám přidán inhibitor o požadované koncentraci (viz tab. 6). Buňky byly s inhibitorem kultivovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> po dobu 1,5 hodiny. Poté byla na buňky aplikována hypertermie ve vodní lázni (vždy po dobu 1h), nebo byla k buňkám přidána chemoterapie v koncentracích uvedených v tabulce – viz níže.

Hypertermie byla aplikována na adherentní buňky prostřednictvím termostaticky kontrolované vodní lázně po dobu 1 hodiny při teplotách 42°C nebo 47°C. Po ošetření vysokou teplotou byly buňky inkubovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a následně byly v předem stanovených časech odebírány jejich alikvoty pro další analýzu.

Pro ošetření chemoterapeutiky byla použita cisplatina o koncentraci 50-60  $\mu\text{mol/l}$  a paclitaxel o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$ .

### 4.2.3 Příprava lyzátů pro Western Blot

Buňky byly sklizeny z kultivačních lahví (viz 4.2.1.1), spočítány (4.2.1.2) rozsazeny na různé podmínky a inkubovány přes noc do 80-90% konfluente. V jednotlivých časových bodech po ošetření byly buňky sklizeny a centrifugovány (1200 rpm, 5 min, 4°C). Sediment buněk byl resuspendován ve 100  $\mu\text{l}$  chladného RIPA lyzačního pufru (viz 4.1.2) a ponechán 20 minut na ledu. Poté byla suspenze centrifugována (13300 rpm, 15 min, 4°C), výsledný supernatant byl odebrán a zamražen.

#### 4.2.3.1 Stanovení koncentrace celkového proteinu

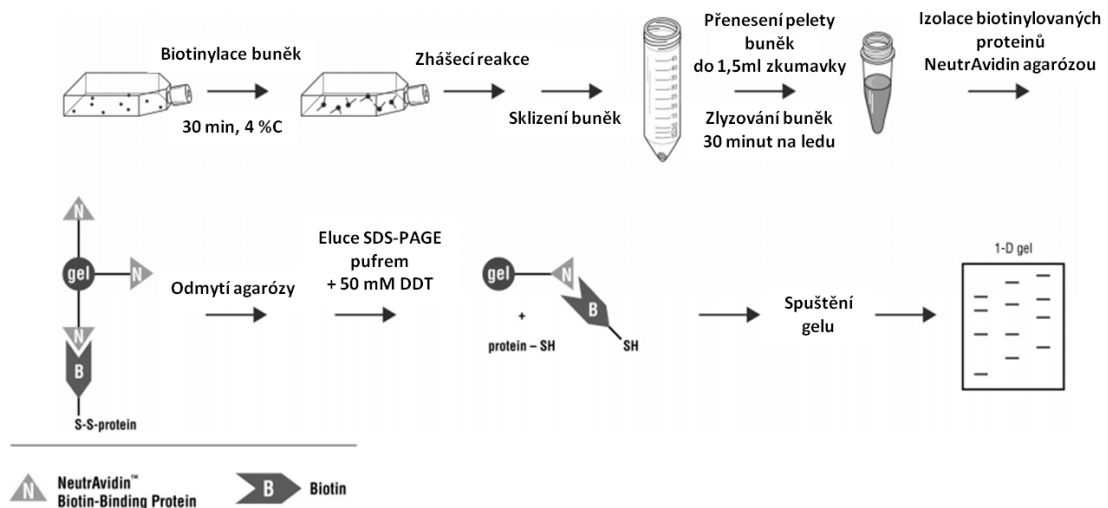
Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech byla stanovena pomocí BCA Protein Assay kitu, založeného na principu metody dle Bradfordové, v 96 jamkové destičce za použití ředící řady BSA pro stanovení koncentrace proteinu v rozmezí 20-2000  $\mu\text{g/ml}$ . Buněčné lyzáty byly naředěny 5x a 10x v RIPA lyzačním pufru (viz 4.1.2) a ke všem vzorkům bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  směsi roztoků A a B smíchaných v poměru 50:1,

## Materiály a metody

dodávaných v kitu. Destička byla kultivována v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> po dobu 30 minut a následně byla hodnoty absorbance v jednotlivých jamkách odečteny pomocí spektrofotometru Tecan (viz 4.1.1) při 560 nm. Z naměřených hodnot standardu byla vytvořena kalibrační křivka, podle které byla vypočítána koncentrace celkového proteinu v jednotlivých vzorcích. Buněčné lyzáty byly doředěny RIPA lyzačním pufrem na stejnou koncentraci a ke všem byl přidán vypočítaný objem 5x koncentrovaného sample pufru v poměru 4:1 na výslednou koncentraci 1x. Vzorky byly nakonec inkubovány v termomixéru (viz 4.1.1) při 95°C po dobu 10-ti minut, následně buď ihned analyzovány či zamraženy a později použity pro western blotovou analýzu.

### 4.2.3.2 Izolace membránové frakce

Pro získání membránové frakce byl použit Cell Surface Protein Isolation kit (viz 4.1.2) (Obr. 10).



Obr. č. 10: **Schéma izolace povrchových proteinů cytoplasmatické membrány.** K buňkám (80-90% konfluency) v tkáňové lánvi byl přidán Sulfo-NHS-SS-Biotin a takto připravené buňky byly inkubovány po dobu 30 minut při 4°C za stálého kývání. K buňkám byl následně přidán zhášecí roztok pro zastavení reakce nenavázaného biotinu. Buňky byly poté trypsinizovány, resuspendovány v lyzačním pufrem a následně dezintegrovány sonikací přístrojem Sonicator 4000 (viz 4.1.1) (30 W, 3-krát 10 sekund). V dalším kroku byla provedena samotná izolace značených membránových proteinů pomocí kolony obsahující roztok NeutrAvidin agarózy, na níž byly selektivně navázány biotinem označené membránové proteiny. Ostatní nenavázané proteiny byly odstraněny centrifugací (1000 x g, 1 min, 4°C) po nanesení promývacích roztoků. Navázané membránové proteiny byly uvolněny po inkubaci se vzorkovým pufrem pro western blot obsahujícím 50 mM DTT (součástí kitu). Takto připravený buňkový lyzáat byl následně použit pro separaci proteinů pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (viz 4.2.4).

### **4.2.3.3 Buněčná frakcionace**

Buněčná frakcionace byla provedena pomocí Cell Fractionation Kitu (Cell signaling) (viz 4.1.2). Součástí kitu byly detergenty pro izolaci tří buněčných frakcí:

- Cytoplasm Isolation Buffer (CIB) pro separaci cytoplazmatické frakce
- Membrane Isolation Buffer (MIB) pro separaci membránové/organelové frakce
- Cytoskeleton/Nucleus Isolation Buffer (CyNIB) pro separaci jaderné/cytoskeletální frakce

Buněčný lyzát byl centrifugován (500 x g, 5 min, 4°C). Peleta buněk byla resuspendována v 500 µl CIB, vortexována po dobu 5 sekund a následně inkubována po dobu 5 minut při 4 °C. Lyzát byl poté centrifugován (500 x g, 5 min, 4°C). Supernatant byl opět odebrán (cytoplazmatická frakce) a peleta buněk byla resuspendována v 500 µl MIB vortexována po dobu 15 sekund a následně inkubována po dobu 5 minut při 4 °C. Lyzát byl poté opět centrifugován (8000 x g, 5 min, 4°C). Supernatant byl odebrán (membránová a organelová frakce). Peleta buněk byla resuspendována v 250 µl CyNIB a sonikována po dobu 5 sekund (cytoskeletální a jaderná frakce). Takto připravené frakce byly použity na western blotovou analýzu (viz 4.2.5).

### **4.2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Pro separaci proteinů byl používán 5% zaostřovací gel a 8, 10 a 12% separační gel v závislosti na molekulární hmotnosti (kDa) analyzovaných proteinů. Na gel bylo nanášeno 5 µl Page Ruler Prestained Protein Ladder (viz 4.1.2), vzorky byly nanášeny buď ve stejné koncentraci – po stanovení koncentrace metodou dle Bradfordové (viz 4.2.3.1), či v koncentraci odpovídající stejnému výchozímu množství buněk (viz 4.2.1.2). Elektroforéza probíhala v Tris-glycinovém pufru (pH 8,0) (viz 4.1.2) po dobu 75 minut při elektrickém napětí 110 V, případně po dobu dokud vzorky nedoputovaly ke spodnímu okraji separačního gelu.

### **4.2.5 Western Blot**

V blotovacím pufru byl složen tzv. „sendvič“, který se skládá z blotovací houby, 3 vrstev filtračního papíru, nitrocelulóзовé membrány, gelu z proběhlé elektroforézy (viz 4.2.5), ze kterého byl odstraněn zaostřovací gel, a dalších 3 vrstev filtračního papíru a blotovací houby. Takto složený sendvič byl vložen do blotovacího zařízení a přelit

vychlazeným blotovacím pufrem. Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu probíhal po dobu jedné hodiny za stálého chlazení při elektrickém napětí 100 V. Po přenosu proteinů na membránu byla membrána obarvena roztokem Ponceau-S (viz 4.1.2) pro potvrzení úspěšného přenosu proteinů. Obarvená membrána byla promyta destilovanou vodou, naskenována a odbarvena roztokem TBST. Poté byla membrána 30 minut blokována v 5 % odtučněném mléce rozpuštěném v TBST a následně inkubována přes noc s primární protilátkou (viz 4.1.4) při 4°C. Druhý den byla membrána promyta 3 x 10 minut v roztoku TBST a inkubována 1 hodinu se sekundární protilátkou (podle specifity myši nebo králíčí) naředěnou v 5 % odtučněném mléce. Poté byla membrána opět opláchnuta 3 x 10 minut v roztoku TBST a inkubována 1 minutu ve vyvolávacím roztoku Super signal west femto maximum sensitivity substrate nebo Super signal west dura extended duration substrate (viz 4.1.2). Vyvolání membrány bylo provedeno v přístroji G-Box (viz 4.1.1) a doba expozice se pohybovala mezi 1 - 5 min. Vyvolaná membrána byla inkubována 5 minut s roztokem Restore Western Blot Stripping Buffer k odstranění navázané protilátky. Membrána byla opět promyta 3 x 10 minut v roztoku TBST, zablokována inkubací po dobu 30-ti minut v 5 % odtučněném mléce v TBST a opakovaně použita pro detekci dalších proteinů. (viz 4.1.4).

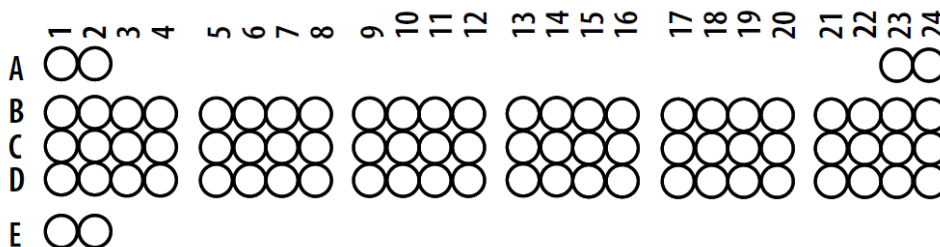
### ***4.2.5.1 Analýza vybraných molekulárních znaků apoptotické buněčné smrti (Human apoptosis array kit, RD systems)***

Součástí Human apoptosis array kitu (RD systems) (viz 4.1.2) jsou 4 nitrocelulózové membrány, z nichž každá obsahuje 35 různých protilátek v duplikátu (viz Tab.7), dále roztok sekundární protilátky, lyzační pufr, pufr pro analýzy (array buffer), promývací pufr a vyvolávací roztok.

Nejprve byly napipetovány 2 ml pufru pro analýzu do 4 - jamkové destičky, obsahující jednotlivé nitrocelulózové membrány a ty byly následně blokovány po dobu 1 hodiny za stálého kývání. Mezitím bylo přidáno 100 µl buněčného lyzátu do 1,25 ml pufru pro analýzu (maximální objem naředěného lyzátu 250 µl/ jamku). Ze 4 - jamkové destičky s nitrocelulózovými membránami byl odpipetován pufr pro analýzu a na membrány byly nanášeny připravené lyzáty. Membrány byly inkubovány přes noc v chladové místnosti při 4°C za stálého kývání. Následující den byly membrány z destičky přeneseny do nádoby s 2 ml promývacího pufru. Destičky byly opláchnuty destilovanou vodou a osušeny. Každá membrána byla poté inkubována v promývacím

pufru 3-krát 10 minut za stálého kývání, aby došlo k odmytí nenavázaných proteinů z lyzátu. Na každou membránu byl nanesen naředěný objem 15  $\mu$ l roztoku sekundární protilátky v 1,5 ml array pufru. Membrány byly následně inkubovány 1 hodinu za stálého kývání. Každá membrána byla poté znovu promyta 3-krát po dobu 10-ti minut. Po odpipetování promývacího pufru byly na každou membránu napipetovány 2 ml Streptavidin-HRP, rozpuštěného v pufru pro analýzu. Membrány byly inkubovány po dobu 30-ti minut za stálého kývání. Po inkubaci byly membrány opět promyty 3-krát po dobu 10-ti minut. Následně byly membrány inkubovány ve vyvolávacím roztoku Chemi Reagent Mix po dobu 1 minuty. Proteiny navázané na membráně byly vizualizovány pomocí přístroje G-Box při délce expozice 1 - 5 minut.

Tab. 7 : Schéma protilátek - Human apoptosis array kit.



Oblast	Detekovaná protilátka/kontrola	Oblast	Detekovaná protilátka/kontrola
A1, A2	Referenční místa	C13, C14	HO-2/HMOX2
A23, A24	Referenční místa	C15, C16	HSP27
B1, B2	Bad	C17, C18	HSP60
B3, B4	Bax	C19, C20	HSP70
B5, B6	Bcl-2	C21, C22	HTRA2/Omi
B7, B8	Bcl-x	C23, C24	Livin
B9, B10	Pro-Kaspáza-3	D1, D2	PON2
B11, B12	Štěpná Kaspáza-3	D3, D4	p21/CIP1/CDKN1A
B13, B14	Catalase	D5, D6	p27/Kip1
B15, B16	cIAP-1	D7, D8	Phospho-p53 (S15)
B17, B18	cIAP-2	D9, D10	Phospho-p53 (S46)
B19, B20	Claspín	D11, D12	Phospho-p53 (S392)
B21, B22	Clusterin	D13, D14	Phospho-p53 (S635)
B23, B24	Cytochrom c	D15, D16	SMAC/Diablo
C1, C2	TRAIL R1/DR4	D17, D18	Survivin
C3, C4	TRAIL R2/DR5	D19, D20	TNF RI/TNFRSF1A
C5, C6	FADD	D21, D22	XIAP
C7, C8	Fas/TNFRSF6/CD95	D23, D24	PBS (Negativní kontrola)
C9, C10	HIF-1 $\alpha$	E1, E2	Referenční místa
C11, C12	HO-1/HMOX1/HSP32		

#### 4.2.6 Analýza průtokovým cytometrem

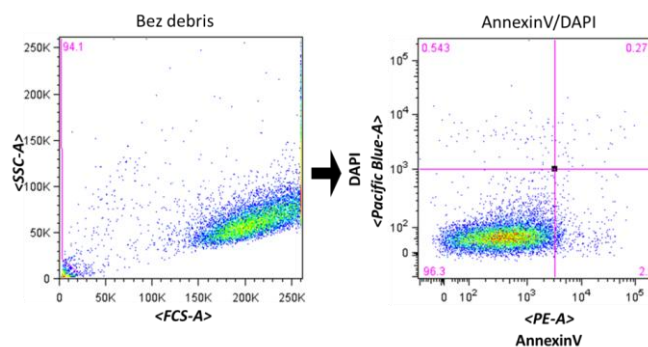
Buňky byly ošetřeny inhibitory a hypertermií/chemoterapií (viz 4.2.2) a přeneseny do 96-jamkové destičky. Následně byly buňky promyty PBS roztokem a centrifugovány (2  $\times$  2200 rpm, 2 min, 4°C). Buňky byly v případě nutnosti fixovány 4%

## Materiály a metody

paraformaldehydem po dobu 20 minut při pokojové teplotě (nebo 70% EtOH po dobu 15 minut při 4°C) a permeabilizovány po dobu 5 minut při pokojové teplotě permeabilizačním pufrem (1:9 v dH<sub>2</sub>O) v PBS, poté byly buňky promyty PBS roztokem a centrifugovány (2 × 2200 rpm, 2 min, 4°C). Inkubace s primární protilátkou a následně sekundární protilátkou proběhla podle nutnosti při 4°, 37°C nebo pokojové teplotě. Buňky byly měřeny na průtokovém cytometru v roztoku PBS, permeabilizačního pufru nebo Annexinového pufru 1× s přidaným DAPI dilactate (viz 4.1.4).

Data byla analyzována za pomoci FlowJo softwaru. Z naměřených dat byl odebrán debris buněk a zbylá populace byla křížem vymezena na čtyři populace a to živé buňky (AnnexinV-/DAPI-), časně apoptotické buňky (AnnexinV+/DAPI-), pozdně apoptotické buňky (AnnexinV+/DAPI+) a nekrotické buňky (AnnexinV-/DAPI+) (viz Obr. 11)

V případě stanovení exprese imunogenních molekul (CRT, Hsp70, Hsp90), fázi buněčného cyklu (PI), proliferační aktivity (KI67), intracelulární exprese p53, mitochondriálního potenciálu (TMRE) a intracelulární koncentrace vápníku (FLUO4-AM) byla naměřená data rovněž analyzována prostřednictvím FlowJo softwaru. Z celkové populace byl opět odebrán debris buněk. Ze zbylé populace byl stanoven aritmetický průměr (mean) pro každý sledovaný parametr. Výsledné hodnoty byly interpretovány jako intenzity fluorescence (MFI) v grafech nebo histogramech, od kterých byla odečtena hodnota sekundární protilátky.



Obr. 11: **Stanovení viability.** Z naměřených dat byl pro další analýzu vyloučen debris buněk a zbylá populace byla křížem vymezena na čtyři populací, a to živých buněk (AnnexinV-/DAPI-), časně apoptotických buněk (AnnexinV+/DAPI-), pozdně apoptotických buněk (AnnexinV+/DAPI+) a nekrotických buněk (AnnexinV-/DAPI+).



#### ***4.2.6.1 Stanovení viability buněk pomocí AnnexinV/DAPI barvení***

Buňky byly promyty PBS roztokem a centrifugovány ( $2 \times 2200$  rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) a následně inkubovány 20 minut ve tmě v barvicí směsi (80  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O, 10  $\mu\text{l}$  1x Annexin binding buffer a 1  $\mu\text{l}$  AnnexinV-AlexaFluor 647 nebo AnnexinV-PE). Po nabarvení byly buňky promyty roztokem 1x Annexin binding buffer a centrifugovány ( $2 \times 2200$  rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Buňky byly měřeny na průtokovém cytometru v roztoku 1x Annexin binding buffer s přidaným DAPI dilactate. Data byla analyzována FlowJo softwarem (viz 4.2.6).

#### ***4.2.6.2 Analýza exprese imunogenních molekul***

Buňky byly promyty PBS roztokem a centrifugovány ( $2 \times 2200$  rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). V případě intracelulárního barvení byly buňky fixovány a permeabilizovány (viz 4.2.6). Poté byly buňky inkubovány 25 minut při  $4^{\circ}\text{C}$  s primární protilátkou (HSP70, HSP90, CRT) naředěnou v PBS (viz 4.1.4). Poté byly buňky promyty PBS roztokem a centrifugovány ( $2 \times 2200$  rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) a následně inkubovány 25 minut při  $4^{\circ}\text{C}$  se sekundární protilátkou (viz 4.1.4) naředěnou v PBS (viz 4.1.4). Buňky byly opět promyty PBS roztokem, centrifugovány ( $2 \times 2200$  rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) a měřeny na průtokovém cytometru (viz 4.2.6).

#### ***4.2.6.3 Barvení fází buněčného cyklu pomocí PI***

Buňky byly rozsazeny do 96 jamkové destičky, promyty PBS roztokem, centrifugovány ( $2 \times 2200$  rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) a poté fixovány v 70 % etanolu po dobu 15 minut při  $4^{\circ}\text{C}$ . Po fixaci byly buňky dvakrát promyty PBS roztokem, centrifugovány ( $2 \times 2200$  rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) a poté inkubovány v barvicí směsi (0,5  $\mu\text{l}$  Propidium iodide, 1  $\mu\text{l}$  RNaseA a 5  $\mu\text{l}$  Triton X-100 1% do 100  $\mu\text{l}$  PBS) po dobu 40 minut při  $37^{\circ}\text{C}$ . Po inkubaci byly buňky opět promyty PBS roztokem, centrifugovány ( $2 \times 2200$  rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) a měřeny na průtokovém cytometru (viz 4.2.6).

#### ***4.2.6.4 Stanovení proliferační aktivity (KI67)***

Buňky byly promyty roztokem PBS a následně fixovány a permeabilizovány (viz 4.2.6). Následně byly buňky inkubovány s KI67 protilátkou (viz 4.1.4) po dobu 30 minut při  $4^{\circ}\text{C}$ . Buňky byly po inkubaci promyty PBS roztokem, centrifugovány ( $2 \times$

2200 rpm, 2 min, 4°C) a proliferační aktivita byla stanovena prostřednictvím průtokového cytometru (viz 4.2.6).

#### **4.2.6.5 Analýza intracelulární exprese p53**

Buňky byly fixovány, permeabilizovány (viz 4.2.6) a inkubovány s protilátkou proti p53 (viz 4.1.4) po dobu 25 minut při 4°C. Poté byly buňky promyty PBS roztokem, centrifugovány (2 × 2200 rpm, 2 min, 4°C) a inkubovány se sekundární protilátkou (viz 4.1.4) naředěnou v 1× permeabilizačním pufru po dobu 25 minut při 4°C. Následně byly buňky promyty PBS roztokem, centrifugovány (2 × 2200 rpm, 2 min, 4°C) a změřeny na průtokovém cytometru (viz 4.2.6).

#### **4.2.6.6 Stanovení mitochondriálního potenciálu**

Tetramethylrhodamine Ethyl Ester Perchlorate (viz 4.1.4) byl po dobu 30 minut kultivován s buňkami v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubaci byly buňky promyty PBS roztokem, centrifugovány (2 × 2200 rpm, 2 min, 4°C) a změřeny na průtokovém cytometru (viz 4.2.6).

#### **4.2.6.7 Stanovení intracelulární koncentrace vápníku**

Pro analýzu intracelulárního vápníku po ošetření hypertermií v čase dané podmínky byla k buňkám přidána fluorescenční próba FLUO4-AM (viz 4.1.4), která byla s buňkami následně kultivována po dobu 2 hodin v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Během inkubace próba prostupuje buněčnou stěnou a váže se na volný vápník v cytosolu. Po provedení prvního kola měření byl k buňkám přidán ionomycin, který způsobí spontánní vylití veškerého zbytkového vápníku ze zásob v endoplazmatickém retikulu do cytosolu. Sonda v médiu se naváže na nově vylitý vápník v cytosolu. Výsledná data byla analyzována průtokovým cytometrem (viz 4.2.6).

#### **4.2.7 Příprava preparátů pro konfokální mikroskopii**

Buňky byly napěstovány na krycích sklech umístěných v 6-ti jamkové tkáňové destičce a ošetřeny hypertermií (viz 4.2.2). Následně bylo odmyto médium, buňky byly promyty roztokem PBS, fixovány a případně permeabilizovány (viz 4.2.6). Zafixované buňky byly inkubovány 30 minut v roztoku 1% BSA v PBS a následně byly buňky inkubovány 25 minut při 4°C s primární protilátkou (viz 4.1.4) naředěnou v PBS nebo 1

× permeabilizačním pufrem. Buňky byly promyty PBS roztokem ( $2 \times 2$  minuty), poté byla k buňkám na 25 minut přidána sekundární protilátka (viz 4.1.4), naředěná v PBS nebo 1 × permeabilizačním pufrem. Buňky byly opět promyty PBS roztokem ( $2 \times 2$  minuty). Na podložní skla bylo aplikováno 15  $\mu$ l montovacího média ProLong Gold Antifade Reagent s DAPI (viz 4.1.2). Krycí skla s buňkami byla přenesena na podložní sklo. Preparáty byly pozorovány konfokálním mikroskopem LCS SP5 (viz 4.1.1).

### **4.2.8 Stanovení intracelulární a extracelulární koncentrace ATP**

Buňky byly sklizeny a v koncentraci 1 milión/ml (viz 4.2.1.2) rozděleny po 1 ml do mikrozkuvek (pro každý čas a podmínku zvlášť), ve kterých byly dále ošetřeny vybraným způsobem (viz 4.2.2). Po ošetření byly buňky kultivovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. V jednotlivých časových bodech byl odebrán a zamražen supernatant buněk (S1), buňky byly rychle zcentrifugovány (1300 rpm, 2 min, 4°C) a byl odebrán další supernatant (S2). Zbytek buněk byl lyzován 1 x permeabilizačním pufrem a výsledný lyzát zamražen (L). Extracelulární koncentrace ATP byla naměřena z S1 a intracelulární koncentrace ATP z S2+L. Měření koncentrace ATP bylo prováděno na přístroji Single Tube Luminometer FB12 (viz 4.1.1).

### **4.2.9 Inhibice genové exprese pomocí siRNA**

Nádorové buňky byly nasazeny do 24-ti jamkové destičky po 50 000 na jamku (viz 4.2.1.2) a byly kultivovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> v příslušném médiu bez antibiotik. Po dosažení 70-90% konfluence bylo médium vyměněno za 0,5 ml čerstvého příslušného média bez antibiotik. 1  $\mu$ l PTEN siRNA o koncentraci 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l bylo naředěno 50  $\mu$ l příslušného média bez přísady antibiotik a séra. Dále byly naředěny 2  $\mu$ l Lipofectaminu RNAiMAX do 50  $\mu$ l příslušného média bez antibiotik a séra. Takto naředěné lipozomy byly inkubovány 20 minut při pokojové teplotě pro docílení enkapsulace nukleové kyseliny do lipozomů. Komplexy DNA a lipidů byly přidány po 100  $\mu$ l do každé jamky s buňkami a médiem. Následně byly buňky inkubovány po dobu 6 hodin v termálním boxu pro docílení interakce pozitivně nabitých lipidů s hydrofobní buněčnou membránou a následného vstupu do cílové buňky. Po inkubaci bylo médium s komplexy odstraněno a k buňkám bylo přidáno čerstvé médium bez antibiotik. Buňky byly přes noc kultivovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Druhý den bylo médium opět vyměněno poté bylo provedeno

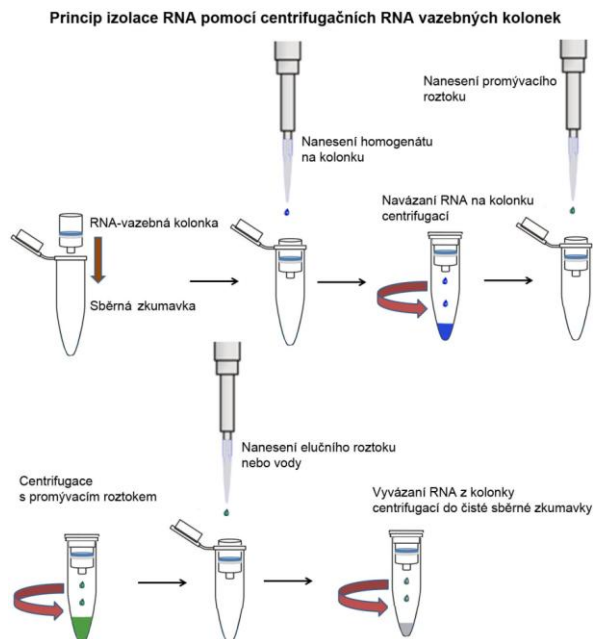
intracelulární barvení (viz 4.2.6) primární protilátkou PTEN a sekundární protilátkou (viz 4.1.4). Účinnost inhibice PTEN byla stanovena prostřednictvím průtokového cytometru (viz 4.2.6).

### **4.2.10 Klonogenní esej**

Buňky byly ošetřeny vybraným způsobem (viz 4.2.2) a spočítány (viz 4.2.1.2). Při sklizení buněk bylo odebrané kondiciované kultivační médium přefiltrováno přes 0,22 µm filtrační jednotku a smícháno v poměru 1:1 s novým kompletním médiem. V tomto kompletním/kondiciovaném médiu (poměr 1:1) byly buňky resuspendovány na koncentraci 56 000 buněk/ml a po 3 ml nasazeny do 6-ti jamkové destičky. Kontrolní neošetřené buňky (pozitivní kontrola) byly nasazeny v koncentraci 30 buněk/ml. Zbytek kompletního/kondiciovaného média byl rozdělen po 3 ml do 6-ti jamkové destičky (slouží jako negativní kontrola). Desky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> po dobu 14 dnů. Po ukončení inkubace bylo médium opatrně z desek vylito a do jamek byla přikapána 0,5% krystalová violet' (cca 200 µl na jamku). Po 3 minutách byly jamky vypláchnuty vodou a ponechány uschnout. Desky byly vyfoceny v přístroji Gbox (viz 4.1.1) a byla odečtena účinnost tvorby kolonií.

### **4.2.11 Izolace RNA**

Pro izolaci RNA byly ošetřené buňky (viz 4.2.2) od každé podmínky spočítány (viz 4.2.1.2) a rozděleny do 1,5 ml zkumavek po 4 milionech na podmínku. Izolace byla prováděna pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu (Quiagen) (viz 4.1.2). Buňky byly centrifugovány (1200 rpm, 5 min, 4°C) a peleta byla resuspendována ve 350 µl RLT lyzačního pufru. K lyzátu byl přidán stejný díl 70% etanolu a vzorek byl pečlivě resuspendován (Obr. 12).



Obr. 12: **Princip izolace RNA pomocí centrifugačních RNA vazebných kolonek.** Celkový objem 700  $\mu$ l vzorku byl přenesen do RNeasy spin column umístěného ve 2 ml zkumavce a centrifugován při 10000 rpm, 15 sekund. Supernatant byl následně odlit. V dalším kroku bylo do kolonky přidáno 700  $\mu$ l RW1 pufru a vzorek byl opět centrifugován při 10000 rpm, 15 sekund s následným odlitím supernatantu. V dalším kroku bylo do kolonky přidáno 500  $\mu$ l RPE pufru s přidavkem etanolu a vzorek byl opět centrifugován při 10000 rpm, 15 sekund s následným odlitím supernatantu. Dále bylo opět přidáno 500  $\mu$ l RPE pufru a vzorek byl centrifugován při 10000 rpm, 2 min. Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a na kolonu bylo přidáno 30  $\mu$ l vody bez přítomnosti RNáz s následnou centrifugací 10000 rpm, 1 min pro izolaci RNA navázané na kolonu. Převzato z: <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyseliny/izolace-rna/>.

U takto izolované RNA byla změřena koncentrace proteinu pomocí spektrofotometrické analýzy prostřednictvím analyzátoru NanoDrop 2000c (viz 4.1.1).

### 4.2.12 Reverzní transkripce

Následující proces byl prováděn v 8 vialkovém stripu. K 15  $\mu$ l vzorku o koncentraci 200 ng byly přidány 4  $\mu$ l iScript pufru a 1  $\mu$ l reverzní transkriptázy iScript (viz 4.1.2). Takto připravený vzorek byl vložen do PCR cycleru (viz 4.1.1) v programu zahrnujícím následující kroky: 5 min při 25°C, 30 min při 42°C, 5 min při 85°C a následné udržování teploty 4°C. Získaná cDNA byla zamražena v -20°C pro další analýzu qPCR (viz 4.2.13).

### 4.2.13 qPCR

qPCR je založena na sledování průběhu PCR přímo během reakce pomocí fluorescenčních sond, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením

## Materiály a metody

své fluorescenční aktivity. Příprava Pre-PCR mixu probíhala v PCR boxu. Poté byla mimo PCR box před samotnou analýzou přidána cDNA. Pre-PCR mix obsahoval na jeden vzorek:

- 1,5 µl injekční voda
- 5 µl Kapa probe fast qPCR master mix
- 0,5 µl 10 µM forward primer
- 0,5 µl 10 µM reverse primer
- 0,5 µl 4 µM sonda

Pre-PCR mix pro každý vzorek byl přepipetován do PCR 96-jamkové destičky. K mixu byly před analýzou přidány 2 µl cDNA. Destička byla přelepena folií, vložena do cycleru a spuštěn PCR protokol:

- 95°C, 3 min (denaturace)
- 95°C, 15 sekund
- 60°C, 1 min
- opakování kroku 2 a 3 49x
- udržování teploty při 15°C (až do vypnutí programu)

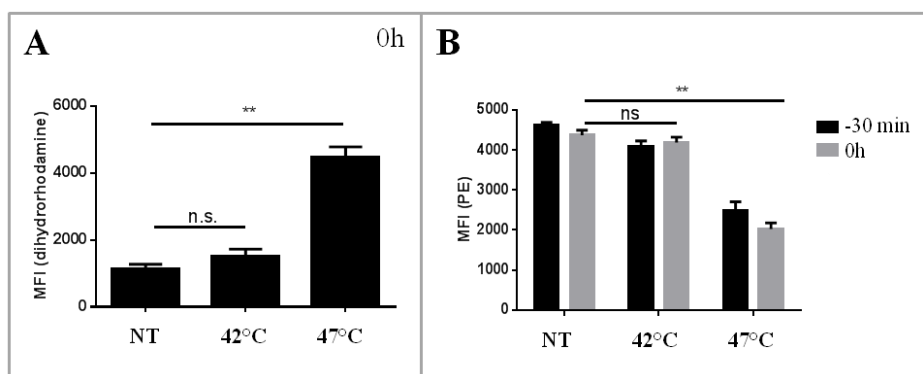
Tab. 8: Seznam použitých primerů.

Primer	Sekvence 5'-3'
p53 Ex6_S	AAggAAATTTgCgTgTggAgTA
p53 Ex6,7_R	ggTACAgTCAgAgCCAACCTCag
PTEN F	CgTTACCTgTgTgTggTgAT
PTEN A	AgTgAAACATTTTgTCCTTTTTTAg
CCNB1 F (Cyclin B1)	ggTgCCAgTgCCAgTgTCT
CCNB1 R (Cyclin B1)	TggAgAggCAgTATCAACCAAAAT
BIRC5 S (Survivin)	gACCCgTTggCAgAggT
BIRC5 A (Survivin)	CCTCggCCATCCgCTC
HSPA5 F (Bip)	AAATTTgAAgAgCTCAACATggATCT
HSPA5 A (Bip)	ggTTTATgCCACgggATggT
PPP1R15A F (GAD34)	CCCTAAAggCCAgAAAaggTg
PPP1R15A A (GAD34)	gATCCCgAgCAAgCTgCT

## 5 Výsledky

### 5.1 Hypertermie vede ke stresové odpovědi zahrnující zvýšenou produkci ROS, únik cytochromu c a nárůst extracelulární hladiny ATP vedoucí k hypoxii a odpovědi na špatně sbalené proteiny

Na základě předchozích výsledků dosažených v naší laboratoři, jejichž cílem bylo charakterizovat aktivaci signálních drah po hypertermii v závislosti na délce a intenzitě stresového podnětu jsme stanovili dvě teploty, jejichž účinek se mezi sebou signifikantně liší. Rozhodli jsme se pro aplikaci mírné hypertermie (42 °C) a intenzivní hypertermie (47 °C). V této sérii experimentů jsme se zaměřili na sledování aktivace stresové odpovědi, ke které dochází bezprostředně po aplikaci hypertermie.

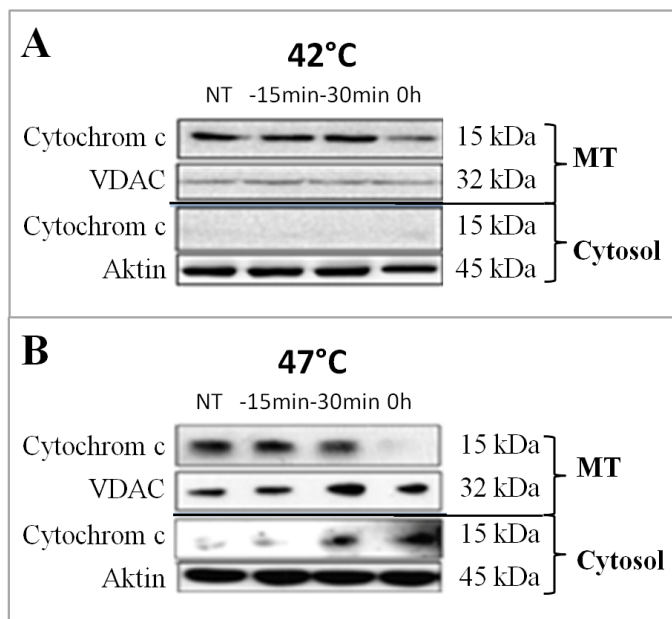


Obr. 13: **Analýza účinku hypertermie na mitochondrie.** Aplikace intenzivní hypertermie vyvolává na rozdíl od mírné hypertermie amplifikaci ROS (A), provázenou poklesem mitochondriálního potenciálu (B).

V tomto experimentu jsme u nádorových buněk linie A549 v čase 0h (výchozí časový bod po aplikaci hypertermie po dobu 1h) analyzovali hladinu ROS u nádorových buněk bez ošetření hypertermie a u nádorových buněk ošetřených 42 °C a 47 °C. Po aplikaci intenzivní hypertermie (47°C) jsme pozorovali signifikantní amplifikaci ROS a následně jsme analyzovali změny mitochondriálního potenciálu. Stanovení změn mitochondriálního potenciálu bylo provedeno pomocí tetramethylrhodamin etheru v časech -30min (30minut od začátku aplikace hypertermie) a 0h (výchozí časový bod - po aplikaci hypertermie po dobu 1h). Mírná hypertermie (42 °C) v porovnání s buňkami neošetřenými hypertermií nevykazuje signifikantní rozdíl mezi změnami mitochondriálního potenciálu v obou časových bodech. Na druhou stranu aplikace

## Výsledky

intenzivní hypertermie (47 °C) má za následek snížení mitochondriálního potenciálu v důsledku stresové reakce spojené s amplifikací ROS (Obr. 13).



Obr. 14: Western blotová analýza proteinů účastnících se změn mitochondriálního potenciálu po hypertermii. Aplikace mírné hypertermie má za následek minimální změny mitochondriálního potenciálu (A). Po intenzivní hypertermii dochází ke změnám mitochondriálního potenciálu, které se projevují nárůstem proteinové hladiny VDAC (z angl. Voltage-dependent anion channel) doprovázeném únikem cytochromu c do cytosolu a v závislosti na časové kinetice (B).

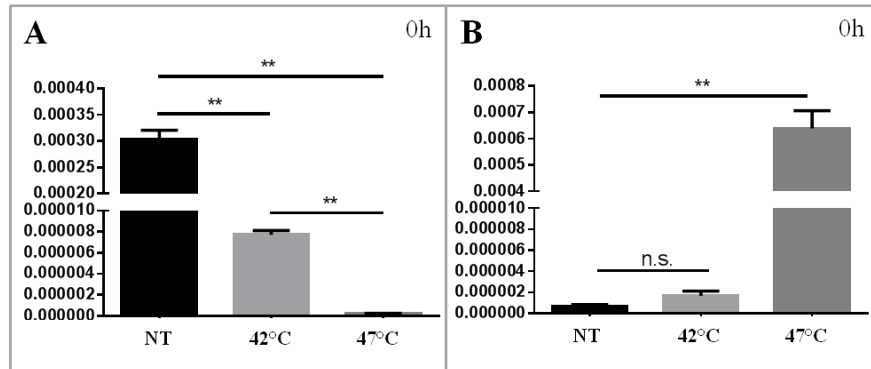
Dále jsme se rozhodli stanovení změn mitochondriálního potenciálu doplnit western blotovou analýzou cytochromu c u nádorových buněk linie A549, který v důsledku kolapsu mitochondriálního potenciálu uniká do cytosolu buňky. Bylo provedeno porovnání mírné hypertermie (42 °C) a intenzivní hypertermie (47 °C) v rámci časové kinetiky. Byly analyzovány buňky neošetřené hypertermií (NT) a ošetřené hypertermií v časech -15 min, -30 min a 0h (výchozí časový bod po aplikaci hypertermie po dobu 1h). Pro každý časový bod byl použit buněčný lyzát izolované membránové frakce a lyzát cytosolické frakce.

Kolaps mitochondriálního potenciálu po aplikaci intenzivní hypertermie (47 °C) má za následek zvýšení permeability mitochondriální membrány, které vede k úniku cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrie do cytosolu a následné aktivaci kaspáz, jejichž štěpení vede přes apoptotickou signalizaci až ke smrti buňky. Cytochrom c hraje zásadní roli v oxidativní fosforylaci uvnitř mitochondrií. Je rovněž znatelná snižující se hladina cytochromu c v mitochondriích, která koreluje se zvyšující se hladinou cytochromu c v cytosolu. Rovněž je zde detekován VDAC (voltage-dependent anion channel), který má funkci mitochondriálního porinu, který je



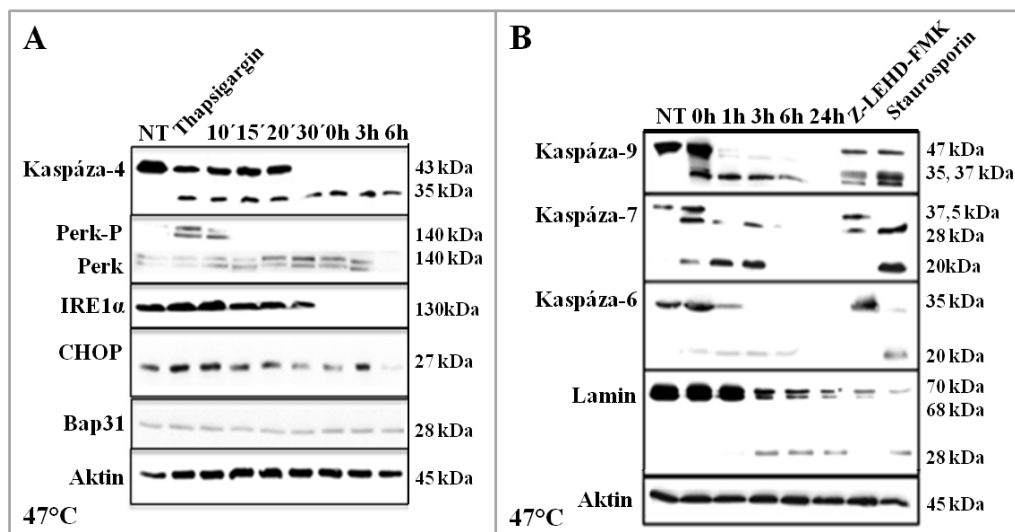
## Výsledky

lokalizovaný na vnější mitochondriální membráně (Obr. 14). Interakcí s proapoptotickým proteinem Bax dochází ke zvětšení póru a cytochrom c se tak dostává z mitochondrie do intracelulárního prostoru.



Obr. 15: Zvýšení extracelulární koncentrace ATP po aplikaci hypertermie. Ošetření nádorových buněk mírnou nebo intenzivní hypertermií má za následek poškození ATPáz s následným unikem ATP z intracelulárního prostoru (A) do extracelulárního prostoru buňky (B).

Dále jsme se zaměřili na stanovení koncentrace extracelulárního ATP, které bylo analyzováno u nádorových buněk linie A549 ošetřených hypertermií v čase 0h (výchozí časový bod po aplikaci hypertermie po dobu 1h). Hladina extracelulárního ATP se po ošetření buněk intenzivní hypertermie (47 °C) signifikantně zvýšila. Zvýšení extracelulárního ATP koreluje se sníženou intracelulární hladinou ATP. Naopak extracelulární koncentrace ATP je po ošetření buněk mírnou hypertermií (42 °C) oproti neošetřeným buňkám nesignifikantně zvýšená (Obr. 15).



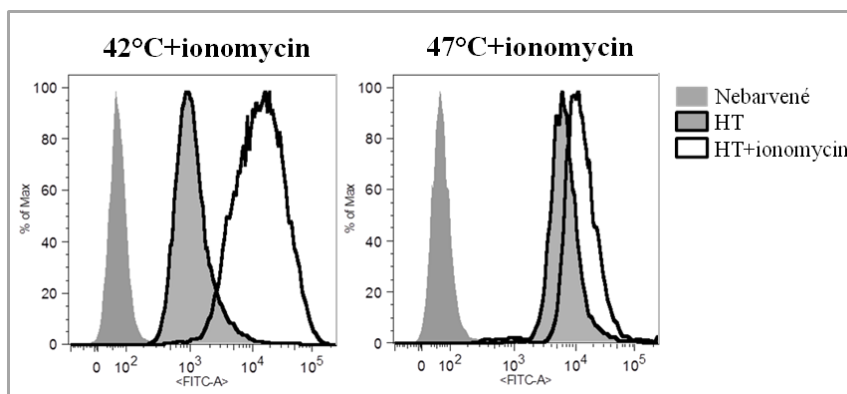
Obr. 16: Stresová odpověď na intracelulární poškození způsobené hypertermií a následná iniciace štěpení kaspáz. Aplikace intenzivní hypertermie na nádorové buňky linie A549 vyvolává aktivaci stresových senzorů endoplazmatického retikula a aktivaci kaspázy 4 (A). Fosforylace stresových

## Výsledky

senzorů může vést až k aktivaci vnitřní apoptotické dráhy iniciované štěpením kaspáz, která vede až k buněčné smrti (B).

Na základě detekovaného úniku cytochromu c z mitochondrií jsme se rozhodli pro western blotovou analýzu aktivace stresové odpovědi a iniciaci apoptotické signalizační dráhy. Na nádorové buňky linie A549 byla aplikována intenzivní hypertermie (47 °C) a následně byla analyzována stresová odpověď endoplazmatického retikula, ke které dochází bezprostředně po ošetření, jak je možno pozorovat v krátké časové kinetice. V rámci stresové odpovědi endoplazmatického retikula na hypertermii dochází k aktivaci senzorů stresu endoplazmatického retikula a aktivace kaspázy 4. Detekovali jsme fosforylaci stresových senzorů (PERK, EIF-2 $\alpha$ ) a dále amplifikaci pro-apoptických proteinů IRE $\alpha$  a CHOP, které se účastní iniciace apoptotické signalizace. Analyzovali jsme rovněž Bap31, k jehož štěpení v rámci apoptotické odpovědi nedochází. Je tomu tak pravděpodobně z důvodu denaturace celého proteinového komplexu vlivem aplikace hypertermie. Jako kontrola byly použity nádorové buňky ošetřené thapsigarginem, který indukuje stresovou odpověď endoplazmatického retikula.

Dále jsme analyzovali aktivaci apoptotické signalizace u nádorových buněk linie A549 rovněž pomocí western blotové metody. V rámci této analýzy jsme se zaměřili na aktivaci a štěpení kaspáz, které se účastní vnitřní dráhy apoptotické signalizace, která může být aktivována právě prostřednictvím úniků cytochromu c z mitochondrií poškozených po intenzivní hypertermii (47 °C). Z důvodu rychlé degradace kaspáz je zde rovněž zobrazeno i štěpení terminálního produktu, v tomto případě laminu. Jako kontrolu jsme použili nádorové buňky ošetřené inhibítorem kaspázy 9 (Z-LEHD-FMK) a staurosporinem, který indukuje spuštění apoptotické dráhy (Obr. 16).

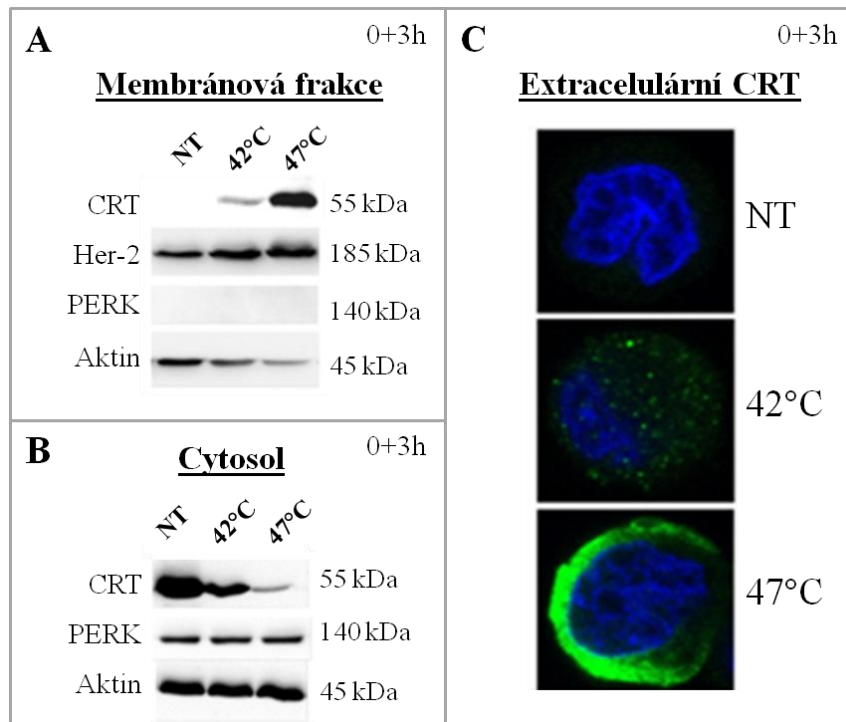


Obr. 17: **Zvýšení hladiny intracelulárního vápníku po hypertermii.** Aplikace intenzivní hypertermie v porovnání s mírnou hypertermií způsobuje signifikantní únik intracelulárního vápníku

## Výsledky

z lumen endoplazmatického retikula. Přídavek ionomycinu způsobí uvolnění zbytku vápníku z intracelulárních zásob.

V dalším experimentu jsme analyzovali množství intracelulárního vápníku uvolněného z lumen endoplazmatického retikula po aplikaci hypertermie. Jako kontrola byly použity u nádorové buňky linie A549 ošetřené hypertermií a ionomycinem, který iniciuje únik veškerého vápníku z lumen endoplazmatického retikula do cytosolu. Porovnání nádorových buněk, na které byla aplikována mírná (42 °C) a intenzivní (47 °C) hypertermie vykazuje signifikantní únik vápníku z endoplazmatického retikula právě v případě aplikace intenzivní hypertermie. V tomto důsledku dochází k narušení striktní vápníkové homeostázi v mitochondriích, která přispívá ke stresové odpovědi mitochondrií (Obr. 17).



Obr. 18: **Nárůst hladiny extracelulárního kalretikulinu po aplikaci hypertermie.** Stresovou odpověď nádorových buněk po aplikaci intenzivní hypertermie doprovází extracelulární vystavování chaperonového proteinu kalretikulinu na povrchu exponované buňky (A, C). Zvýšení extracelulární hladiny kalretikulinu koreluje s úbyvající hladinou kalretikulinu v cytosolu (B).

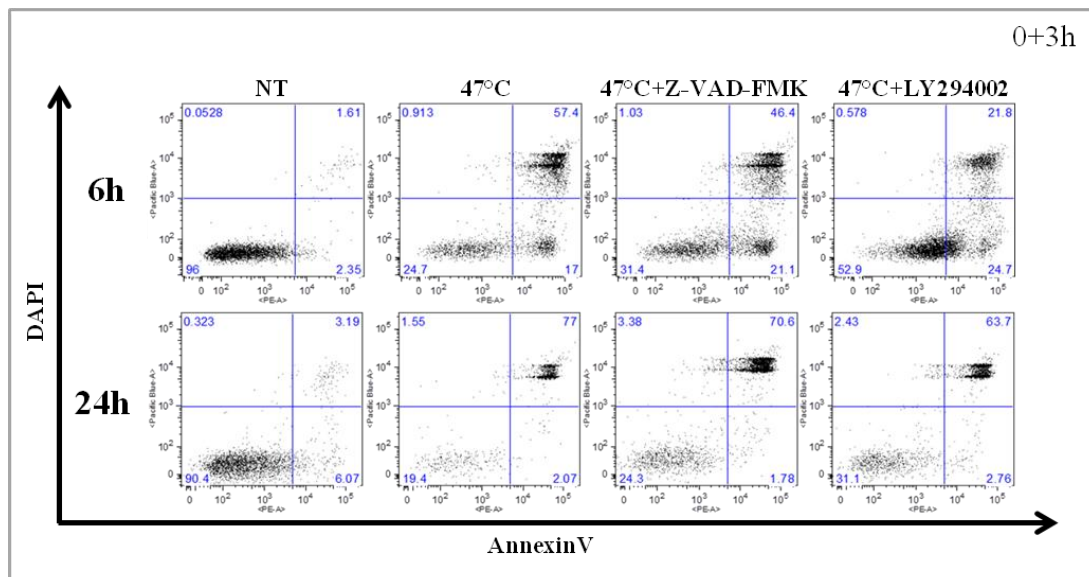
Nárůst hladiny kalretikulinu vystaveného na povrchu nádorových buněk linie A549 po aplikaci hypertermie jsme analyzovali pomocí metody konfokální mikroskopie. Na základě získaných dat, je zřejmá signifikantní amplifikace extracelulárního kalretikulinu v čase 0+3h po ošetření hypertermií. Panel byl doplněn western blotovou analýzou srovnání lokalizace kalretikulinu v izolované membránové frakci a cytosolu. Hladina kalretikulinu lokalizovaného na membránové frakci koreluje

## Výsledky

s ubývajícím množstvím kalretikulinu v cytosolu. Správnost izolace membránové frakce byla potvrzena pozitivní detekcí Her-2 a naopak nepřítomností proteinu PERK na membráně. Přítomnost PERK byla naopak prokázána v cytosolu (Obr. 18).

### 5.2 Částečná inhibice PI3K aktivity vede ke zvýšenému přežívání nádorových buněk ošetřených hypertermií

Studium transportu kalretikulinu na povrch buňky za použití různých inhibitorů nás dovedlo k zajímavému objevu. Částečná inhibice aktivity PI3K za použití inhibitoru PI3K (LY294002) vede ke zvýšené rezistenci nádorových buněčných linií vůči ošetření hypertermií. Je známo, že nádorová transformace bývá často spojena se zvýšenou basální hladinou aktivity PI3K nebo ztrátou jeho hlavního negativního regulátoru PTEN.



Obr. 19: Vliv inhibitorů vybraných signálních drah na viabilitu nádorových buněk po ošetření hypertermií. Aplikace pan-kaspázového inhibitoru (Z-VAD-FMK) s následným ošetřením hypertermií u nádorové buněčné linie A549 nevykazuje signifikantní rozdíl v porovnání s viabilitou nádorových buněk ošetřených pouze hypertermií. Inhibice PI3K (LY294002) před aplikací hypertermie má za následek téměř 20% benefit na přežívání v porovnání s nádorovými buňkami, na které byla aplikována pouze hypertermie.

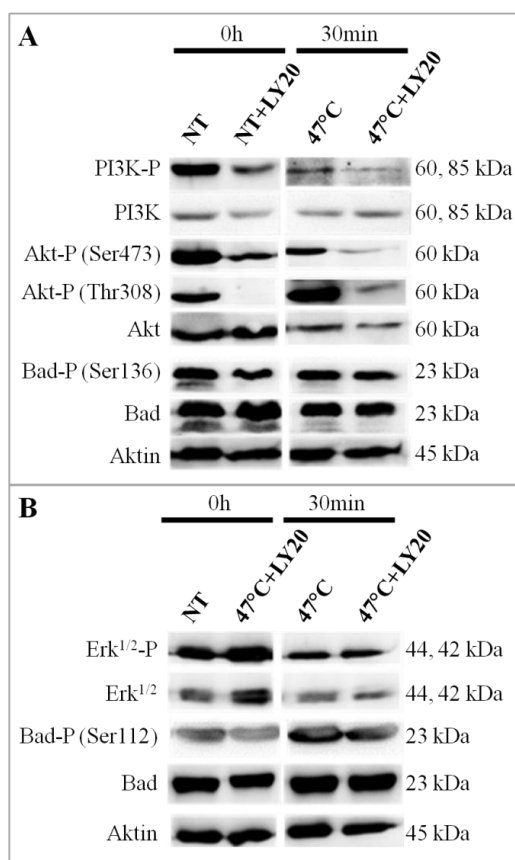
Nádorové buňky linie A549 byly nejprve ošetřeny inhibitory PI3K - LY294002 (20  $\mu$ M) a apoptózy - Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M) s následným ošetřením intenzivní hypertermií (47 °C). U takto ošetřené buňky byla analyzována viabilita pomocí průtokového cytometru v časech 6h a 24h po aplikaci hypertermie. V porovnání nádorových buněk ošetřených inhibitorem LY294002 s následnou aplikací hypertermie

## Výsledky

jsme prokázali až o 30% vyšší přežívání než u nádorových buněk ošetřených pouze hypertermií (Obr. 19).

### 5.3 Hypertermie u nádorových buněk vyvolává aktivaci signalizace přežívání regulovanou přes PI3K/Akt/mTOR dráhu

Hypertermií ošetřené nádorové buňky mimo apoptotické signalizace zároveň spouští záchranné signální mechanismy, které následně mohou vyústit v přežití buňky.

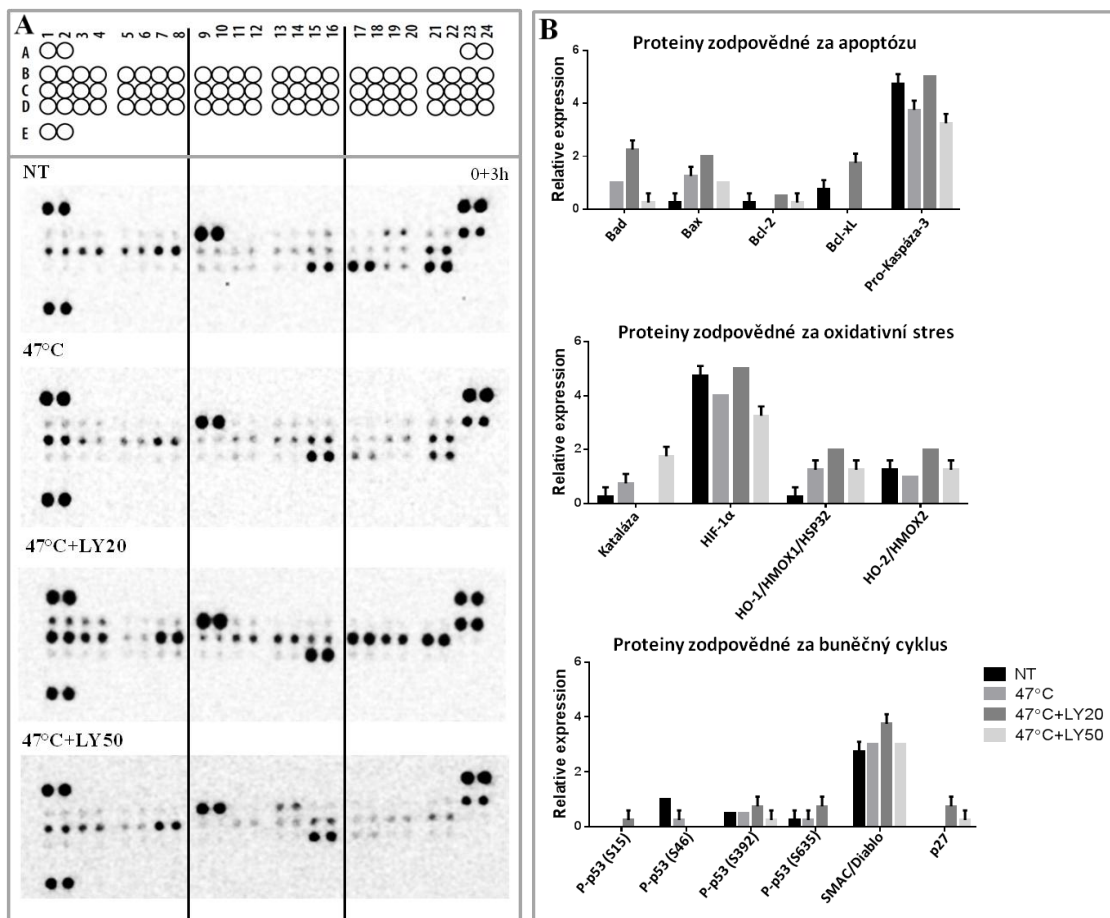


Obr. 20: Western blotová analýza signalizace v ose PI3K/Akt/mTOR po ošetření hypertermií ve srovnání s výsledky získanými po aplikaci hypertermie v kombinaci s inhibítorem PI3K (LY294002). Inkubace buněk v přítomnosti 20  $\mu$ M inhibitoru LY294002 ( ) má za následek snížení fosforylace Akt na Thr308 se zachovanou fosforylací na Ser473 (A). Ošetření inhibítorem LY294002 nemá vliv na aktivitu MAPK (Erk1/2) (B).

Rozhodli jsme se analyzovat vybrané proteiny v ose PI3K/Akt/mTOR na nádorové buněčné linii A549, na kterou byl aplikován inhibitor LY294002 (20  $\mu$ M) s následným ošetřením intenzivní hypertermií (47 °C). Nádorové buňky byly analyzovány v časech -30min a 0h (výchozí časový bod po aplikaci hypertermie po dobu 1h). Inhibitor LY294002 (20  $\mu$ M) v této koncentraci pouze částečně potlačuje fosforylací PI3K, která se projevuje na snížení fosforylace Akt na aminokyselinovém

## Výsledky

zbytku Thr308 se zachovanou fosforylací Akt na aminokyselinovém zbytku Ser473. Vedle PI3K a Akt jsme se zaměřili i na pro-apoptický protein Bad, jehož fosforylace na aminokyselinovém zbytku Ser136 (zprostředkovaná Akt) nevykazuje rozdíl v porovnání s nádorovými buňkami ošetřenými inhibítorem LY294002 s následnou hypertermií a nádorovými buňkami, na které byla aplikována pouze hypertermie. Rovněž fosforylace MAPK Erk1/2 (regulující buněčnou proliferaci) se v porovnání těchto dvou podmínek signifikantně neliší.



Oblast	Detek. protilátka/kontr.	Oblast	Detek. protilátka/kontr.	Oblast	Detek. protilátka/kontr.
A1, A2	Referenční místa	B23, B24	Cytochrom c	D1, D2	PON2
A23, A24	Referenční místa	C1, C2	TRAIL R1/DR4	D3, D4	p21/CIP1/CDKN1A
B1, B2	Bad	C3, C4	TRAIL R2/DR5	D5, D6	p27/Kip1
B3, B4	Bax	C5, C6	FADD	D7, D8	Phospho-p53 (S15)
B5, B6	Bcl-2	C7, C8	Fas/TNFRSF6/CD95	D9, D10	Phospho-p53 (S46)
B7, B8	Bcl-x	C9, C10	HIF-1 $\alpha$	D11, D12	Phospho-p53 (S392)
B9, B10	Pro-Kaspáza-3	C11, C12	HO-1/HMOX1/HSP32	D13, D14	Phospho-p53 (S635)
B11, B12	Štěpená Kaspáza-3	C13, C14	HO-2/HMOX2	D15, D16	SMAC/Diablo
B13, B14	Catalase	C15, C16	HSP27	D17, D18	Survivin
B15, B16	cIAP-1	C17, C18	HSP60	D19, D20	TNF R1/TNFRSF1A
B17, B18	cIAP-2	C19, C20	HSP70	D21, D22	XIAP
B19, B20	Claspin	C21, C22	HTRA2/Omi	D23, D24	PBS (Negativní kontrola)
B21, B22	Clusterin	C23, C24	Livin	E1, E2	Referenční místa

Obr. 21: Analýza hladin proteinů účastnících apoptózy, zastavení buněčného cyklu, opravy DNA a hypoxie. Horní panel představuje western blotovou analýzu (Apoptosis array kit, RD Biosystems)

## Výsledky

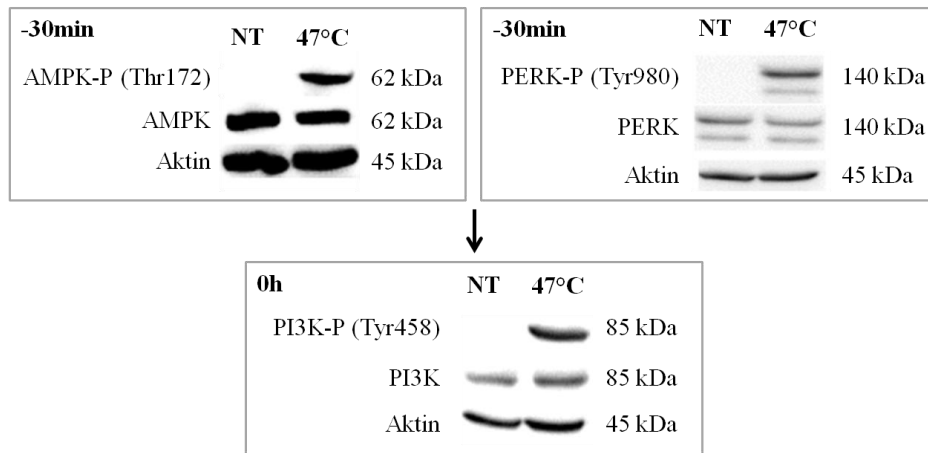
analyzující aktivaci stresové odpovědi vedoucí k apoptotické signalizaci (A), , rovoji reakce na oxidativní stres a regulace buněčného cyklu (B). Na dolním panelu je popis rozmístění analyzovaných proteinů.

Následně jsme provedli analýzu intracelulárních hladin vybraných proteinů účastnících se regulace buněčné smrti, zastavení buněčného cyklu, oprav poškozené DNA a hypoxie nádorové buněčné linie A549. Buněčný lyzát byl připraven z neošetřených buněk (NT), nádorových buňky ošetřených intenzivní hypertermií (47 °C) a nádorových buněk, na které byl aplikován inhibitor LY294002 (20 μM, 50 μM) s následným ošetřením intenzivní hypertermie (47 °C) v čase 0+3 po hypertermii. V rámci stresové odpovědi na intenzivní hypertermii (47 °C) dochází k opravám poškozené DNA, která je doprovázena zastavením buněčného cyklu, ATM/ATR a DNA-PK signalizaci vedoucí k fosforylaci a aktivaci p53 na Ser15, která je posílena snížením interakce mezi p53 a jeho negativním regulátorem Mdm-2. Snížení hladiny CIA-1 a XIAP signalizuje aktivaci pro-apoptotické signalizace následované štěpením kaspázy 3. Apoptotická signalizace je rovněž podpořena anti-apoptotických proteinů (survivin) a amplifikaci HSP (Obr. 21).

Následně byly použity nádorové buňky linie A549 neošetřené hypertermií (NT) a buňky ošetřené intenzivní hypertermií (47 °C), ze kterých byl připraven buněčný lyzát pro western blotovou analýzu v časech -30 minut a 0h (výchozí časový bod po aplikaci hypertermie po dobu 1h). Po aplikaci intenzivní hypertermie (47 °C) po dobu 30 minut je znatelný signifikantní nárůst fosforylace AMPK na Thr172, ke které dochází v důsledku zvýšení poměru intracelulárního AMP/ATP. Paralelně dochází rovněž ke stresové odpovědi endoplazmatického retikula, která je detekována fosforylací PERK na aminokyselinovém zbytku Tyr980. Fosforylace PERK má za následek rozvoj stresové odpovědi na špatně sbalené proteiny. Fosforylace AMPK a fosforylace PERK mohou vést k fosforylaci a následné aktivaci PI3K.

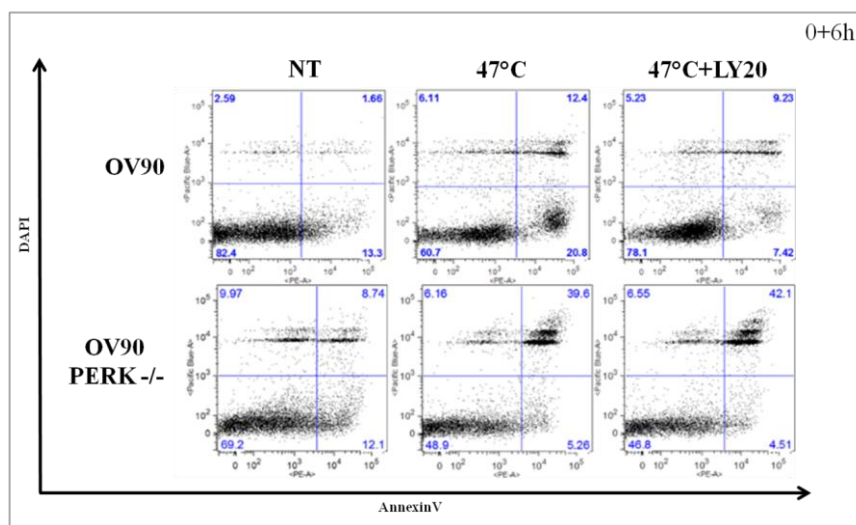


## Výsledky



Obr. 22: **Analýza iniciace stresové odpovědi, která vede ke spuštění záchranných mechanismů u nádorových buněk po hypertermii.** Vlivem intracelulárního stresu dochází k fosforylaci AMPK, která je aktivována změnou poměru AMP/ATP. Paralelně je fosforylován PERK, který tak reguluje na stres endoplazmatického retikula. Obě tyto fosforylace aktivují fosforylaci PI3K a iniciují tak spuštění záchranných mechanismů v buňce.

V dalším experimentu jsme se rozhodli zjistit, jestli je přítomnost stresového senzoru PERK důležitá pro přežití nádorových buněk OV90 a OV90 PERK  $-/-$ , na které byly ošetřeny intenzivní hypertermií (47 °C) po předchozí inkubaci v přítomnosti inhibitoru LY294002 (20  $\mu$ M). Účelem experimentu bylo prokázat, že u nádorové buněčné linie OV90 dochází po aplikaci hypertermie ke spuštění záchranných mechanismů prostřednictvím fosforylace stresového senzoru endoplazmatického retikula PERK. Na základě získaných dat jsme prokázali význam aktivace proteinu PERK ve spuštění PI3K signalizace (Obr. 23).



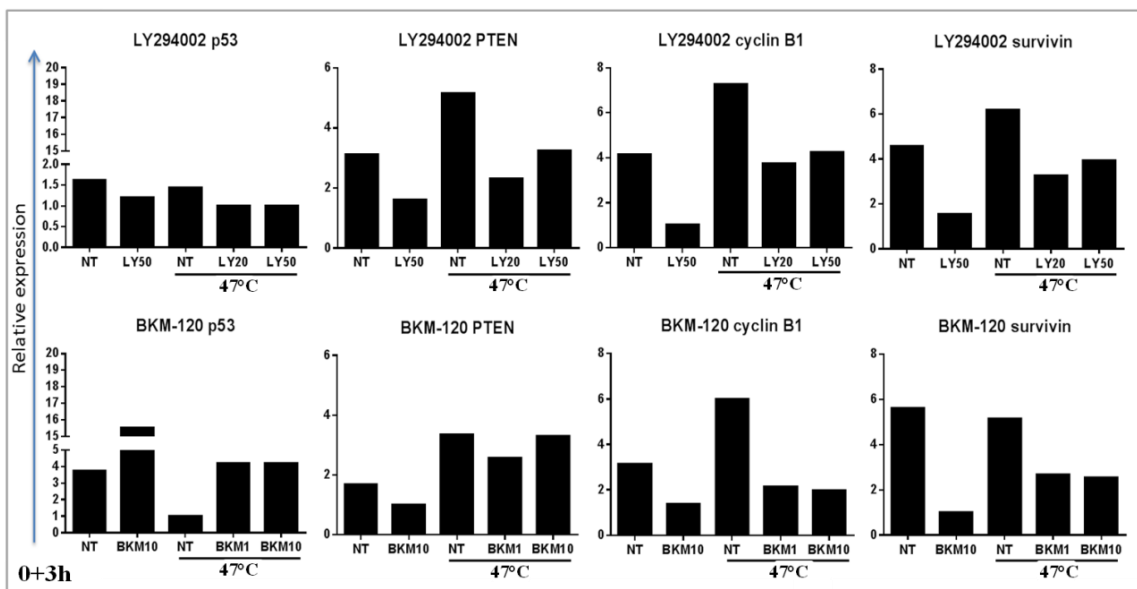
Obr. 23: **Viabilita nádorové buněčné linie OV90 po aplikaci inhibitoru PI3K (LY294002) a ošetření hypertermií.** Porovnání viability nádorové buněčné linie OV90 a OV90 PERK  $-/-$  prokázalo



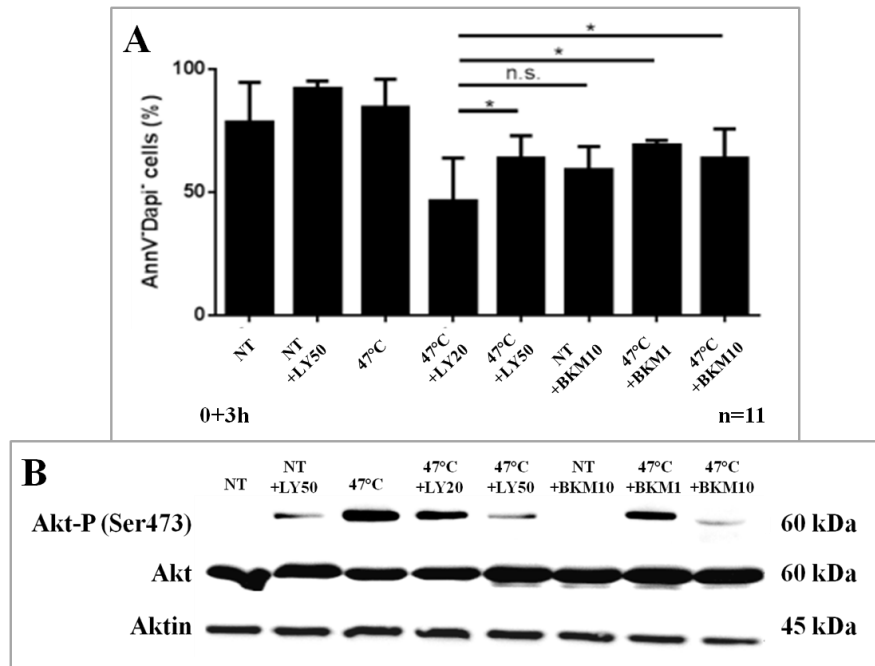
## Výsledky

význam aktivačního signálu molekuly Perk vůči PI3K v přežívání nádorových buněk po aplikaci inhibitoru LY294002 s následnou hypertermií.

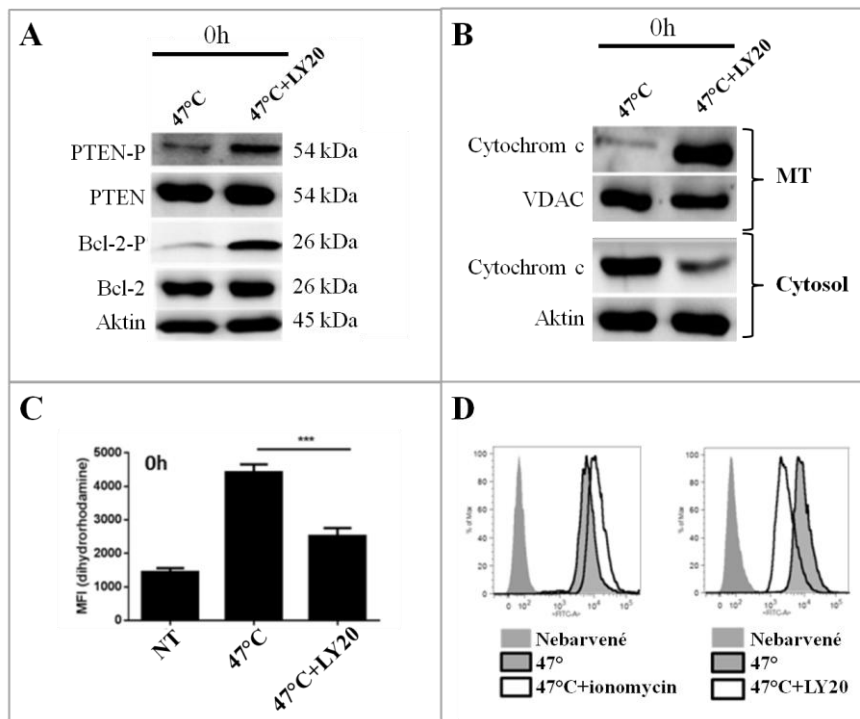
Pro inhibici PI3K jsme se rozhodli provést sérii experimentů na klinicky používaném inhibitoru PI3K (BKM-120). Účelem experimentů bylo porovnat působení inhibitorů LY294002 a BKM-120 na inhibici fosforylace PI3K a následné fosforylaci Akt na aminokyselinovém zbytku Ser473 u nádorové buněčné linie A549. Výsledky poukazují na podobné efekty ve srovnání inhibitoru BKM-120 (1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ ), a LY294002 (20  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ ) u buněk neošetřených hypertermií (NT) a ošetřených intenzivní hypertermií (47°C). Paralelně byla změřena rovněž životnost nádorových buněk, které byly ošetřeny za stejných podmínek, jako v případě western blotové analýzy (Obr. 24, 25).



Obr. č. 24: Analýza qPCR detekující změny v expresi proteinu p53, PTEN, cyclin B1 a survivin. Na molekulární úrovni byly za pomoci metody qPCR analyzovány změny v expresi proteinu p53 (zastavení buněčného cyklu a následná iniciace oprav DNA), PTEN (přirozený intracelulární inhibitor PI3K), cyklinu B1 (regulátor přechodu z G2 do M fáze) a survivinu (anti-apoptotická signalizace) po ošetření inhibitory PI3K (LY294002 a BKM-120) s následnou aplikací intenzivní hypertermie.



Obr. č. 25: **Efekt inhibitorů PI3K na Akt-P (Ser473)**. Analýza viability nádorové buněčné linie A549 ošetřené inhibitory PI3K (LY294002 a BKM-120) (A). Doplněná western blotovou analýzou srovnávající fosforylaci Akt (Ser473) po ošetření inhibitory s následnou hypertermií. (B).

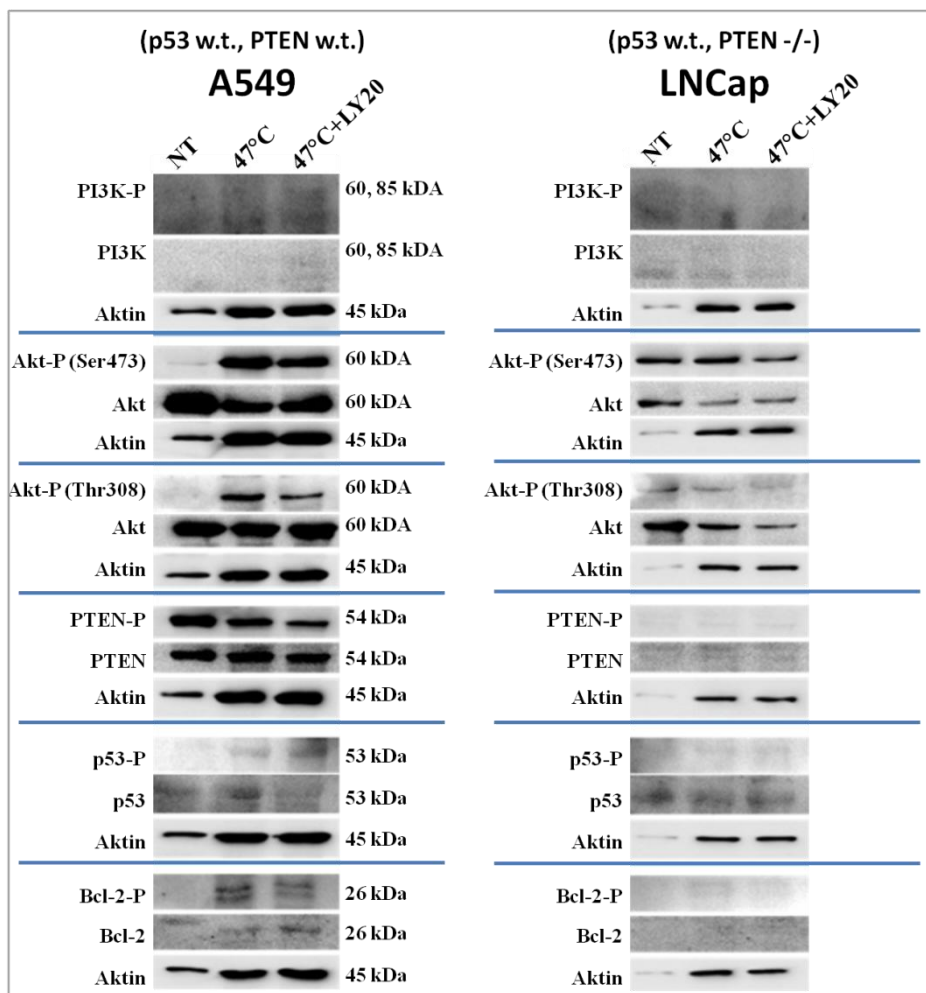


Obr. č. 26: **Protektivní efekt na nádorové buňky ošetřené inhibitem LY294002 s následnou hypertermií**. Zvýšení fosforylace PTEN po aplikaci LY294002 má za následek rovněž fosforylaci Bcl-2, která vede k inaktivaci tohoto pro-apoptotického proteinu (A). Následkem toho je potlačen únik cytochromu c z mitochondrií (B) s výsledným protektivním efektem na vnitřní mitochondriální membránu (C) a sníženou hladinu cytosolického vápníku (D).

Pro porovnání efektu PTEN v přežívání nádorových buněk po hypertermii jsme se zaměřili na dvě nádorové buněčné linie A549 (p53 w.t., PTEN w.t.) a LNCap (p53

## Výsledky

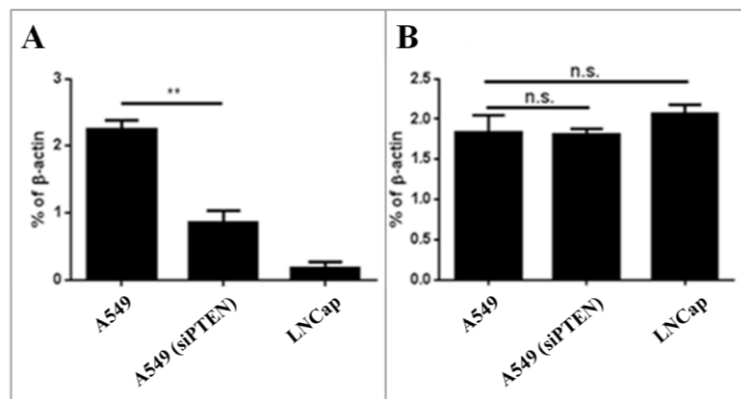
w.t., PTEN -/-). Rozdíly v aktivaci signálních drah PI3K/Akt/mTOR v závislosti na přítomnosti PERK byly analyzovány pomocí western blotové metody. Na základě výsledků jsme potvrdili, že aktivita PTEN může být regulována proteinem p53 a naopak. Po aplikaci intenzivní hypertermie (47 °C) spolu s částečnou inhibicí aktivity PI3K inhibitorem LY294002 (20 μM) u nádorové buněčné linie A549. Nádorový supresor p53 může být fosforylován ATM, ATR a DNA-PK na Ser15. Aktivace této fosforylace snižuje interakci MDM2 s p53 a jeho následnou degradaci. Dochází k akumulaci a aktivaci p53 jako odpověď na poškození DNA. Na druhou stranu stejný efekt není vidět v případě nádorových buněčných linií LNCap, kterým chybí funkční PTEN. Na základě těchto výsledků jsme potvrdili podstatu přítomnosti PTEN na získání benefitu přežívání po částečné inhibici PI3K (Obr. 27).



Obr. 27: Porovnání aktivace proteinů vybraných signálních drah u nádorových buněčných linií, lišících se ve statusu PTEN. Analýza aktivace signálních drah PI3K/Akt/mTOR v porovnání mezi nádorovou buněčnou linií A549 (PTEN w.t.) a LNCap (PTEN -/-).

#### 5.4. Interakce p53 a PTEN hraje jednu z hlavních rolí v přežívání nádorových linií po hypertermii s částečnou inhibicí PI3K.

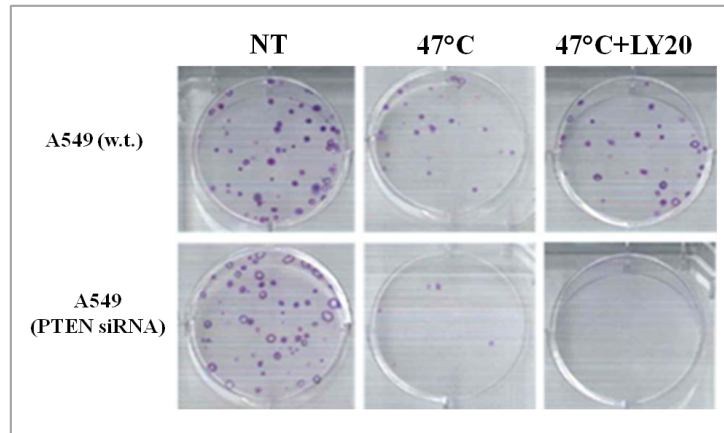
Pomocí qPCR jsme analyzovali hladiny exprese proteinů u nádorových buněčných linií A549 a LNCap. Podle očekávání byly hladiny mRNA PTEN u nádorové buněčné linie LNCap (p53 *w. t.*/ PTEN *-/-*) signifikantně snižené. Na druhou stranu hladiny mRNA PTEN byla u nádorové buněčné linie A549 (p53 *w. t.*/ PTEN *w. t.*) vysoká. Dále jsme provedli transfekci linie A549 PTEN siRNA (p53 *w. t.*/ PTEN *-/-*), aby bylo možné porovnat důsledky ztráty příspěvku PTEN na přežití v rámci jedné buněčné linie po ošetření intenzivní hypertermií v kombinaci s částečnou inhibicí PI3K (Obr. 27).



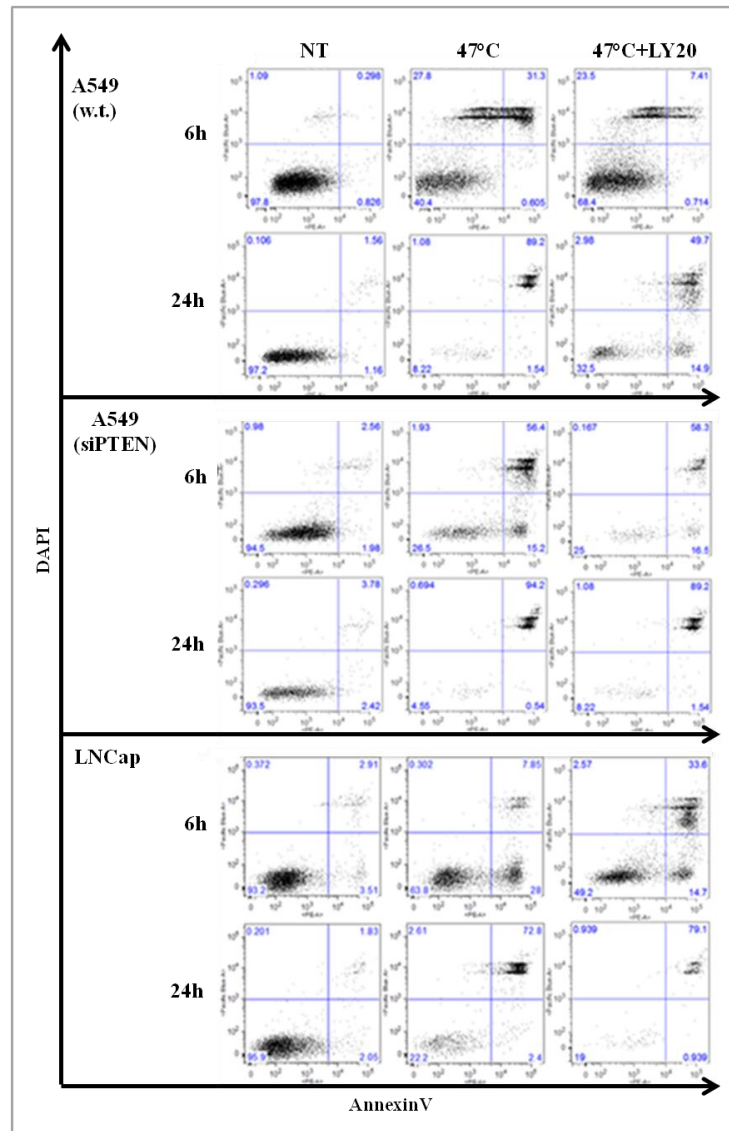
Obr. 27: Analýza bazální hladiny mRNA PTEN a p53 u nádorových buněčných linií. Transfekce nádorové buněčné linie A549 (siPTEN) s výsledným signifikantním snížením mRNA PTEN v porovnání s nádorovou buněčnou linií LNCap (PTEN *-/-*) (A). Analýza bazální hladiny mRNA p53 u nádorové buněčné linie A549 (p53 *w. t.*) a LNCap (*w. t.*) (B).

Rozhodli jsme se prokázat význam PTEN v porovnání mezi A549 (PTEN *w. t.*) a A549 PTEN siRNA v dlouhodobém přežívání a proliferaci po ošetření inhibitorem LY294002 (20 μM) s následnou intenzivní hypertermií (47 °C). Z výsledných dat je patrné, že narostlé kolonie buněk ošetřených inhibitorem a hypertermií u A549 nádorových buněk v porovnání s A549 (siPTEN) jsou průkazem fungující spolupráci mezi p53 a PTEN a jejich rolí v proliferační aktivitě (Obr. 28).

## Výsledky



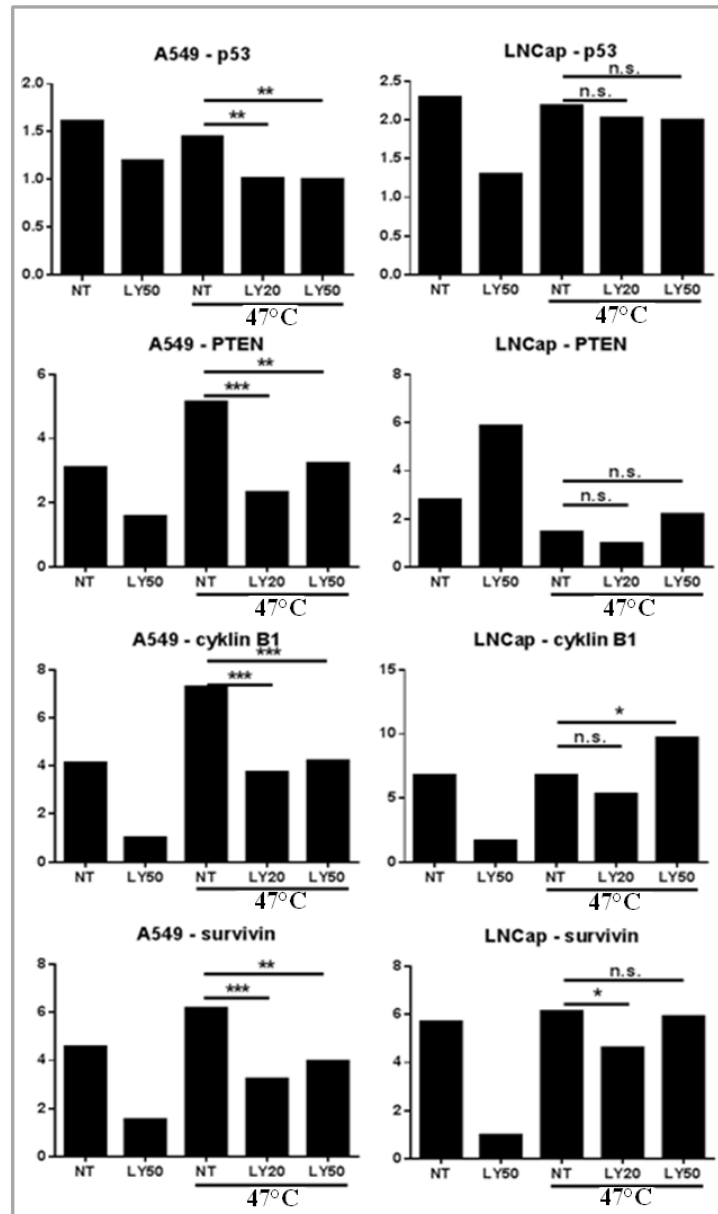
Obr. 28: **Analýza dlouhodobého přežívání v závislosti na přítomnosti PTEN.** Snížená proliferační aktivita nádorové buněčné linie A549 (PTEN siRNA) je výsledkem absence spolupráce mezi PTEN a p53, který iniciuje zastavení buněčného cyklu a opravy poškozené DNA po hypertermii.



Obr. 29: **Analýza viability** nádorové buněčné linie A549 (PTEN *w. t.*), A549 (PTEN siRNA) a LNCap (PTEN *-/-*) lišících se ve statusu proteinu PTEN. Pro získání benefitu přežívání po částečné inhibici PI3K (LY294002, 20  $\mu$ M) s následnou intenzivní hypertermií (47  $^{\circ}$ C) je podstatná přítomnost

## Výsledky

PTEN, jak je pozorovatelné u nádorové buněčné linie A549 a ve srovnání s nádorovými buněčnými liniemi, které mají sníženou (A549 siPTEN) či téměř nulovou hladinu PTEN (LNCap PTEN -/-), kde nedochází ke zvýšení viability u buněk ošetřených inhibitorem PI3K s následnou hypertermií.



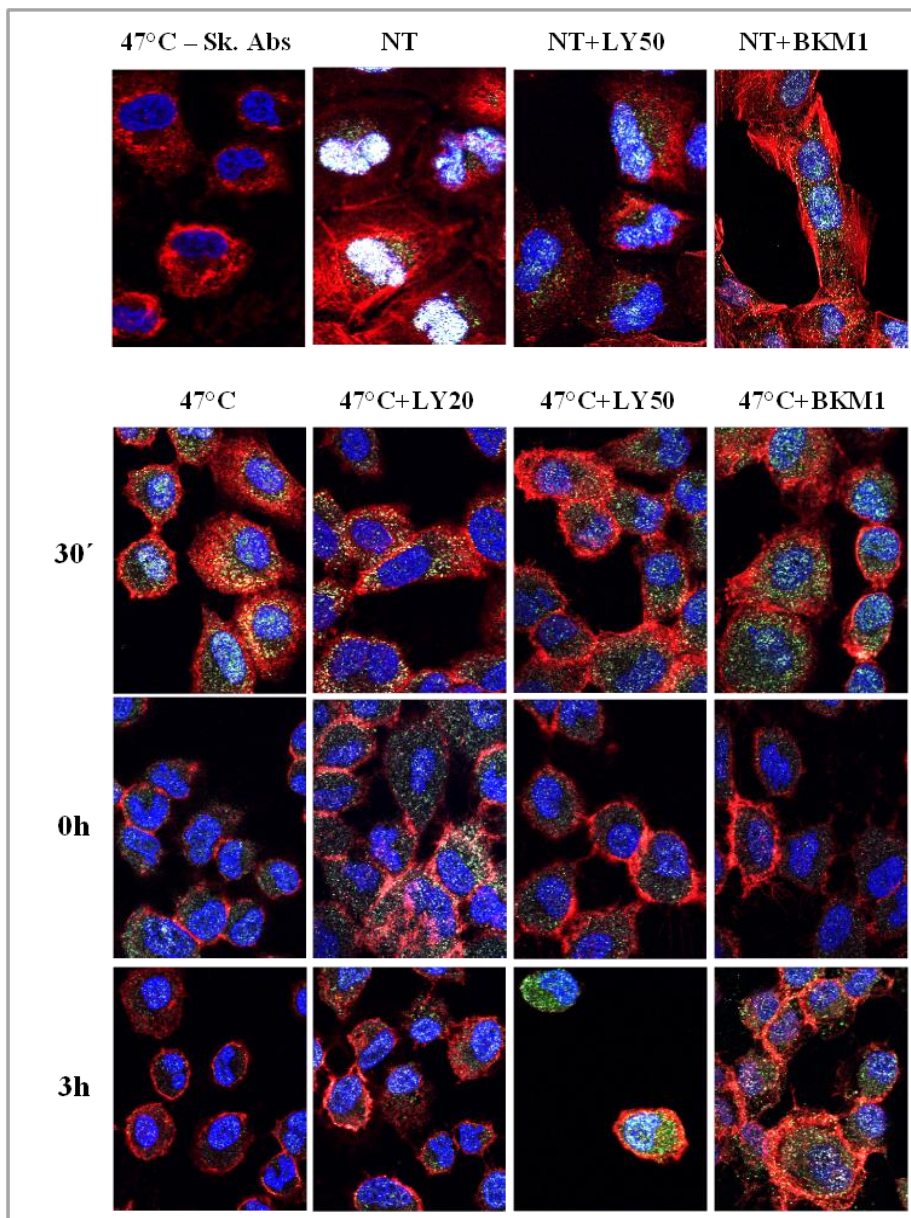
Obr. 30: Analýza qPCR exprese proteinů p53, PTEN, cyklin B1 a survivinu. V analýze změn v expresi proteinů p53, PTEN, cyklin B1 a survivin byly porovnány exprese dvou nádorových buněčných linií A549 (p53 *w. t.*, PTEN *w. t.*) a LNCap (p53 *w. t.*, PTEN -/-), které byly ošetřeny inhibitorem PI3K (LY294002) s následnou aplikací intenzivní hypertermie (47 °C).

Pro zhodnocení rozdílu mezi nádorovými buněčnými liniemi se statusem PTEN *w. t.* a PTEN -/- jsme se rozhodli porovnat rozdíly efektů částečné inhibice PI3K inhibitorem LY294002 (20  $\mu$ M a 50  $\mu$ M) a BKM-120 (1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M) s následnou aplikací intenzivní hypertermie (47 °C) na nádorové buněčné linii SK-MES1, která má status p53 -/-. Tento status byl ověřen na proteinové úrovni rovněž prostřednictvím



## Výsledky

western blotové analýzy v porovnání s nádorovou buněčnou linií A549 (p53 *w. t.*). Na základě získaných dat jsme vyhodnotili, jak přítomnost PTEN, tak proteinu p53 a jejich vzájemná interakce je podstatná pro zisk benefitu přežívání nádorových buněk po částečné inhibici PI3K s následnou intenzivní hypertermií (47 °C) (Obr. 32).

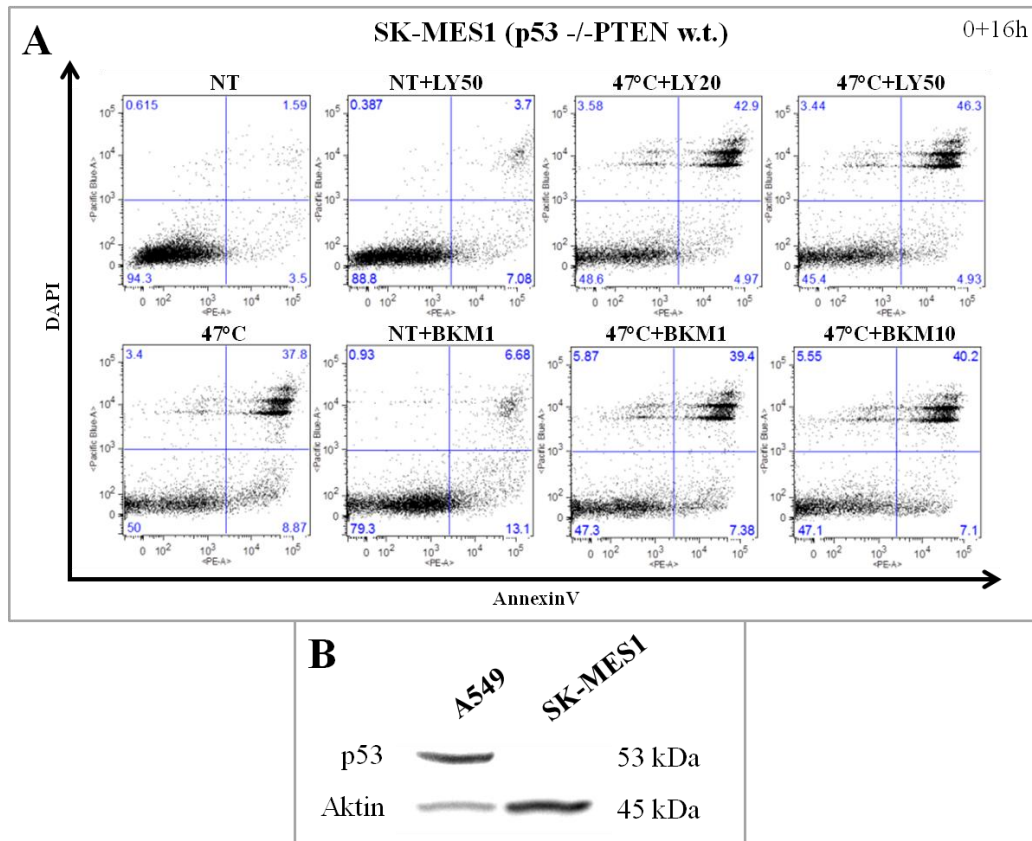


Obr. č. 31: Změna vnitrobuněčné lokalizace PTEN a p53 po ošetření inhibitory PI3K.

Vnitrobuněčnou lokalizaci PTEN a p53 po ošetření inhibitory PI3K (LY294002 a BKM-120) s následnou aplikací intenzivní hypertermie (47 °C) jsme analyzovali pomocí konfokální mikroskopie na nádorové buněčné linii A549. Ošetření nádorových buněk inhibitory PI3K vede ke změně vnitrobuněčné lokalizace PTEN (bíle). Dochází k částečnému přesunu PTEN z jádra do cytosolu, kde v kombinaci s efekty hypertermie

## Výsledky

umožňuje buňkám přežítí svojí interakcí jak s p53 v jádře, tak s anti-apoptotickými proteiny rodiny Bcl-2 v cytosolu. A zatímco u buněk vystavených pouze účinkům hypertermie dochází k úplné zástavě buněčného cyklu, u buněk ošetřených inhibitorem je tato zástava pouze částečná, umožňující nejen opravy DNA, ale rovněž obnovu proliferace i díky snížené hladině ROS.



Obr. č. 32: Stanovení viability nádorové buněčné linie SK-MES1 po ošetření inhibitory PI3K. Aplikací inhibitorů PI3K (LY294002 a BKM-120) s následným ošetřením hypertermií u nádorové buněčné linie SK-MES1 (p53<sup>-/-</sup>, PTEN w. t.) nedochází k získání benefitu přežívání po aplikaci inhibitoru. Byla tak prokázána podstata přítomnosti nádorového supresoru p53 na spuštění záchranných mechanismů (zastavení buněčného cyklu a opravy poškozené DNA) (A). Analýza statusu p53 pomocí western blotové analýzy na nádorové buněčné linii SK-MES (p53<sup>-/-</sup>) v porovnání s nádorovou buněčnou linií A549 (p53 w. t.) (B).

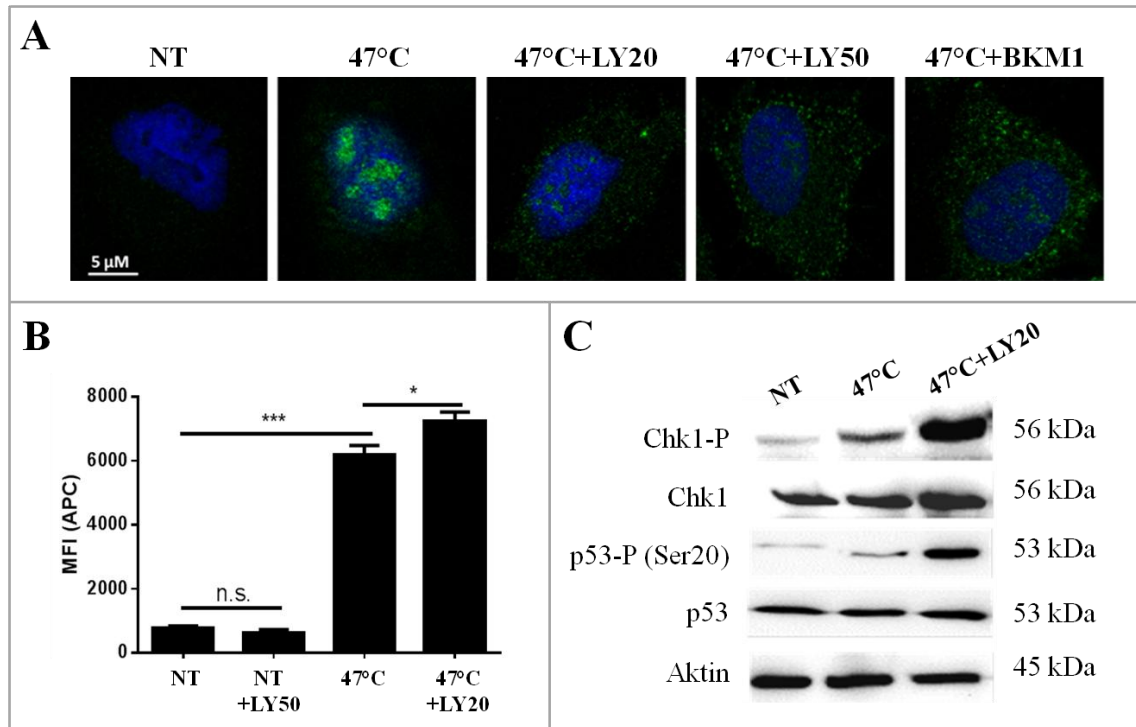
### 5.5 Termoprotekce po částečné inhibici PI3K má za následek stabilizaci p53 a jeho translokaci z jádra do cytosolu.

Nádorový supresor p53 je podstatný pro iniciaci oprav DNA, se kterou je spojeno zastavení buněčného cyklu po aplikaci hypertermie. Nádorové buňky linie A549 byly ošetřeny PI3K inhibitorem LY294002 (20  $\mu$ M a 50  $\mu$ M) a BKM-120 (1  $\mu$ M) s následnou aplikací intenzivní hypertermie (47 °C). Takto ošetřené buňky byly



## Výsledky

analyovány pomocí konfokální mikroskopie. Po aplikaci intenzivní hypertermie (47 °C) dochází k translokaci p53 do jádra, kde iniciuje zastavení buněčného cyklu s následnými opravami poškozené DNA. Částečná inhibice PI3K má za následek stabilizaci proteinu p53 a jeho zpětnou translokaci z jádra do cytosolu. Fosforylace proteinu p53 na Ser20 a následná aktivace Chk-1 má za následek sníženou interakci mezi p53 a jeho negativním regulátorem MDM2 (Obr. 33).

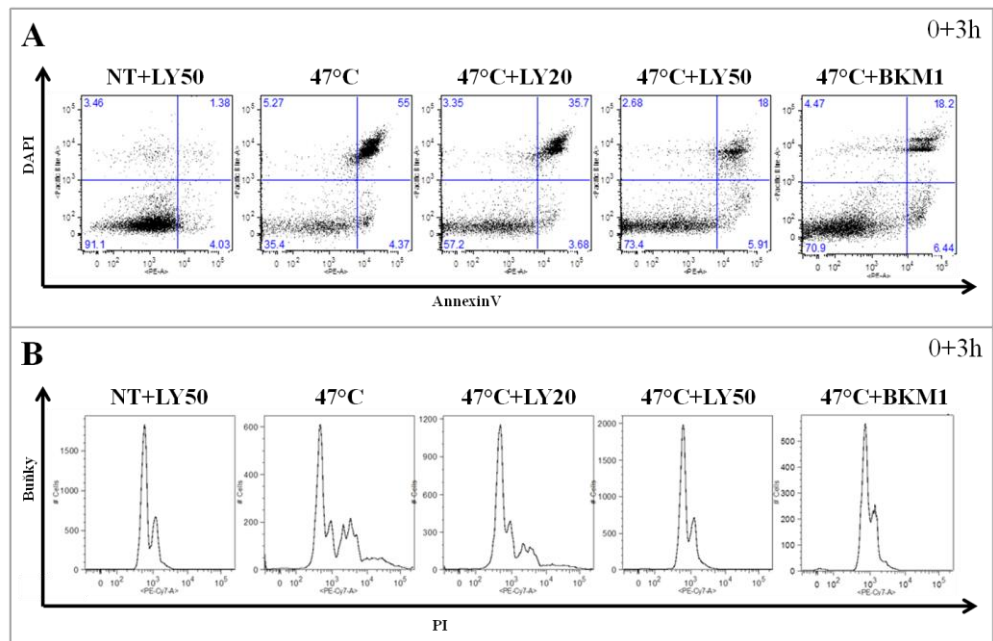


Obr. 33: **Amplifikace a následná stabilizace p53 v jádře iniciuje zastavení buněčného cyklu a opravy poškozené DNA po hypertermii.** Ošetření hypertermií u nádorové buněčné linie A549 má za následek translokaci p53 do jádra, kde dochází k zastavení buněčného cyklu a opravným procesům poškozené DNA (A). Rovněž dochází po zvýšené stabilizaci p53 po aplikaci LY294002 s následnou hypertermií (B). Ošetření inhibítorem aktivuje fosforylaci p53 (Ser20), který dále aktivuje fosforylaci Chk-1. Fosforylovaný Chk-1 snižuje interakci mezi p53 a jeho negativním regulátorem MDM2, čímž dochází k amplifikaci p53 (C).

Aplikace inhibitorů PI3K v kombinaci s hypertermií vede k signifikantnímu zvýšení přežívání u nádorových buněčných linií A549, které je rovněž doloženo analýzou buněčného cyklu. U nádorových buněk ošetřených pouze hypertermií lze pozorovat částečnou blokádu v G2/M fázi buněčného cyklu. Po částečné inhibici PI3K a následné stabilizaci p53 v cytosolu je zastavení buněčného cyklu kompletní (Obr. 33). Vzhledem k následnému dlouhodobému přežívání buněk ošetřených kombinací PI3K inhibitoru a intenzivní hypertermie (viz kap. 5.4) lze předpokládat, že pozorovaná zástava buněčného cyklu je u některých buněk pouze dočasná (inhibice progresu

## Výsledky

buněčného cyklu je vyvolána již před aplikací hypertermie) a je provázána intenzivními opravami teplem poškozené DNA.

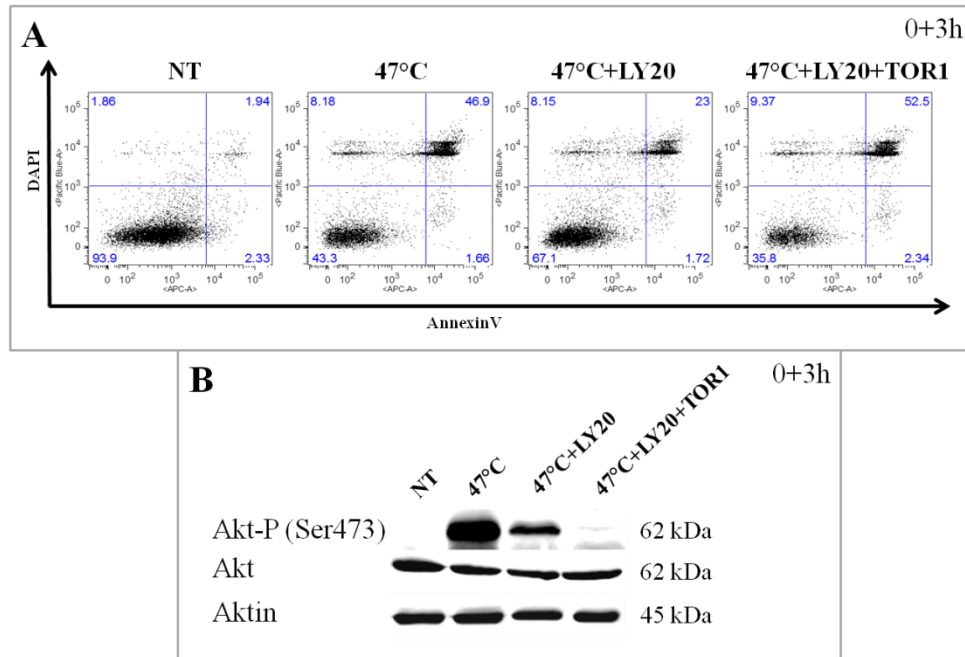


Obr. 34: Stanovení viability a analýza buněčného cyklu po aplikaci inhibitorů PI3K (LY294002, BKM-120) s následnou hypertermií. Inkubace buněk A549 v přítomnosti inhibitorů PI3K (LY294002, BKM-120) s následnou aplikací intenzivní hypertermie má za následek zvýšený benefit přežívání u nádorové buněčné linie A549 (A), která je doplněna paralelní analýzou buněčného cyklu (B).

## 5.6 Zachovaná fosforylace Akt na aminokyselinovém zbytku Ser473 zprostředkovaná TORC2 má stěžejní význam pro funkční signalizaci umožňující přežívání nádorových buněk po hypertermii.

Pro osvětlení významu fosforylace Akt na aminokyselinovém zbytku Ser473 jsme se rozhodli pro aplikaci inhibitoru torinu 1, který má mimo jiné schopnost inhibovat aktivitu mTOR, hlavně jeden z jeho komplexů, mTORC2. Na nádorové buňky linie A549 byl aplikován LY294002 (20  $\mu$ M) a torin 1 (1  $\mu$ M) s následným ošetřením intenzivní hypertermií (47 °C). Viabilita takto ošetřených nádorových buněk byla analyzována pomocí průtokové cytometrie a aktivita Akt byla dokumentována výsledky z western blotu. Na základě získaných dat jsme prokázali, že mTORC2 je zodpovědný za fosforylaci Akt na Ser473. Částečná inhibice PI3K spolu s inhibicí mTORC2 pak mají za následek ztrátu benefitu přežívání a pravděpodobně rovněž snížení dlouhodobého přežívání a proliferace (Obr. 35).

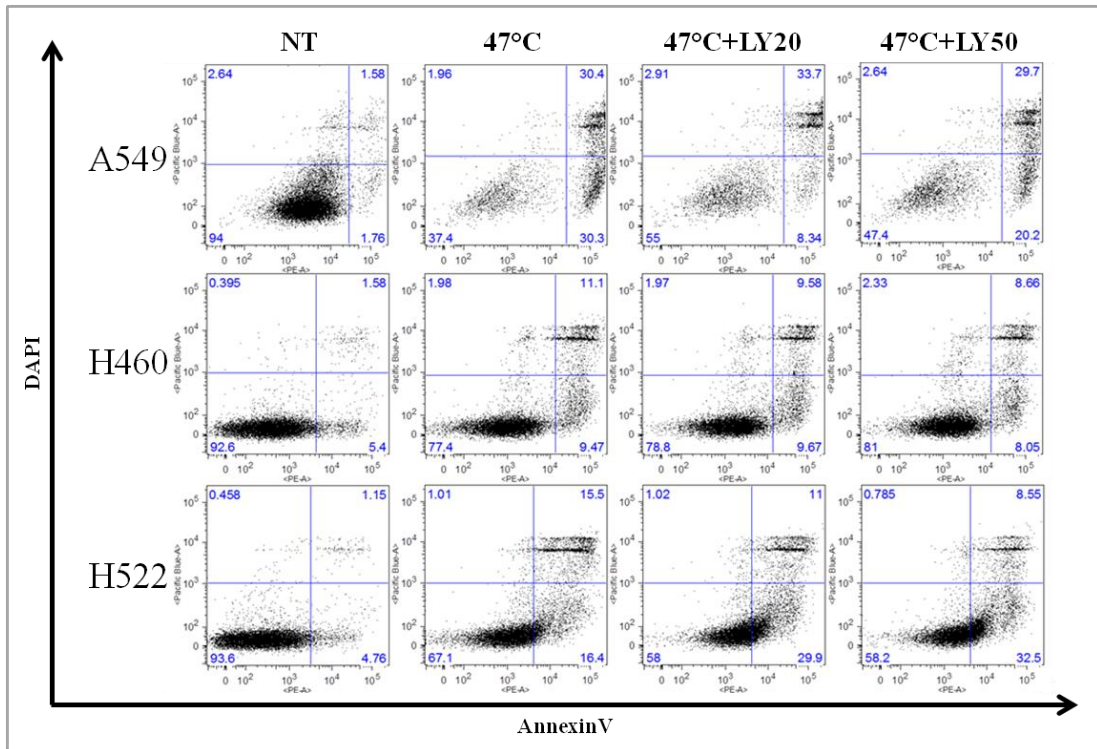
## Výsledky



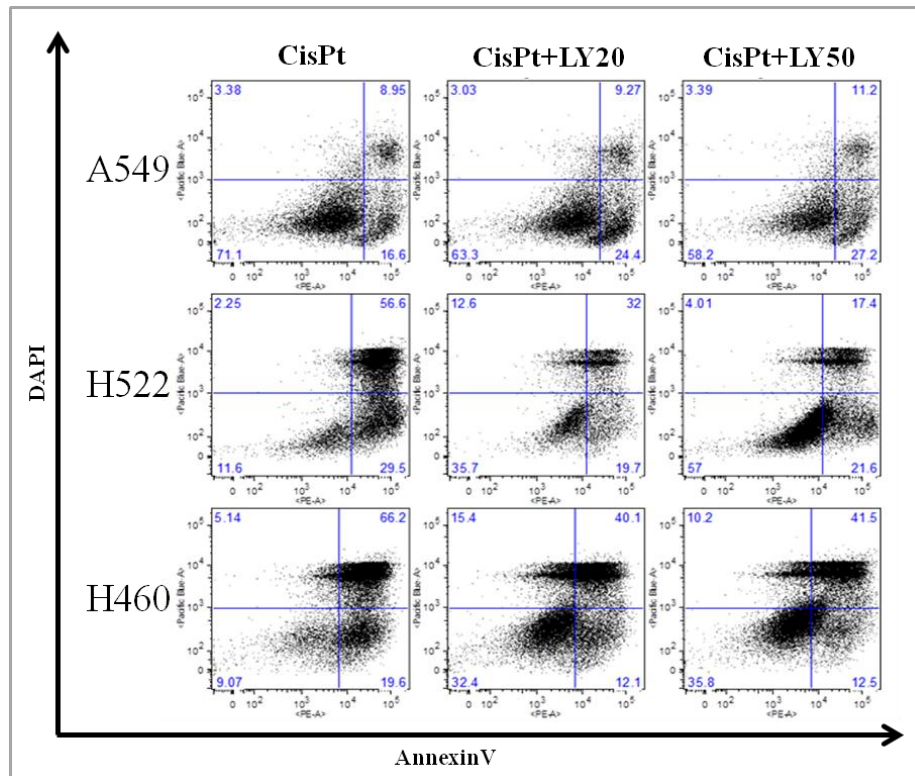
Obr. 35: Zachovaná fosforylace Akt (Ser473) je zásadní pro přežívání u nádorových buněk ošetřených inhibítor PI3K (LY294002) s následnou aplikací hypertermie. Aplikace inhibitoru mTORC2 (torin 1) spolu s inhibítor PI3K (LY294002) a následnou aplikací intenzivní hypertermie má za následek signifikantní snížení viability v porovnání s nádorovými buňkami ošetřenými inhibítor LY294002 a hypertermií (A). mTORC2 je zásadní pro zachování fosforylace Akt na Ser473, jak je ukázáno i v kontextu western blotové analýzy (B).

### 5.7 Částečná inhibice aktivity PI3K může zvýšit přežívání u vybraných plicních nádorových linií rovněž po ošetření cisplatinou

Závěrem jsme porovnali efekt částečné inhibice PI3K na vybrané nádorové linie po aplikaci hypertermie a chemoterapie. V následujícím experimentu jsme sledovali viabilitu vybraných plicních nádorových linií (A549, H460, H522), které mají status *p53 w. t.* a *PTEN w. t.* (různé publikované hladiny) (Blanco et al., 2009) po částečné inhibici PI3K inhibítor LY294002 (20  $\mu$ M a 50  $\mu$ M) a následné aplikaci intenzivní hypertermie (47 °C). V případě nádorové buněčné linie A549 dochází k již očekávanému benefitu přežívání buněk s částečnou inhibicí PI3K a následnou hypertermií v porovnání s nádorovými buňkami ošetřenými pouze hypertermií. Nádorové buněčné linie H460 a H522 za stejných podmínek žádný signifikantní benefit ve viabilitě nevykazují.



Obr. 36: Porovnání viability vybraných nádorových plicních linií po přidání inhibitoru PI3K a následné hypertermii. Částečná inhibice PI3K s následnou hypertermií vyvolává u nádorové buněčné linie A549 zvýšené přežívání v porovnání s buňkami ošetřenými pouze hypertermií. Na druhou stranu nádorové linie H460 a H522 tento benefit přežívání za stejných podmínek nevykazují.

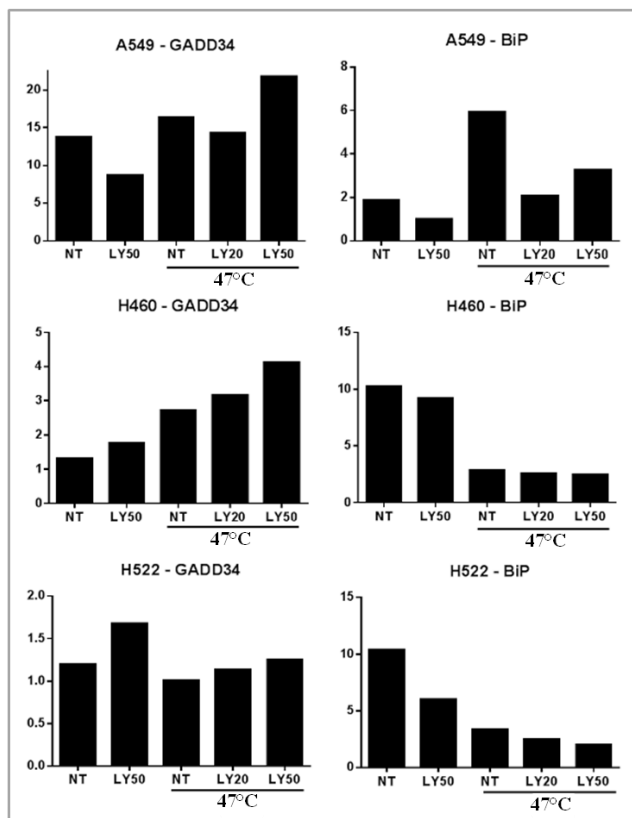


Obr. 37: Analýza viability nádorových buněčných linií A549, H522 a H460 po aplikaci inhibitoru PI3K (LY294002) a následném ošetření cisplatinou. Nádorová linie A549 nevykazuje benefit přežívání jako tomu tak bylo v případě hypertermie. Naopak inkubace nádorových buněčných linií

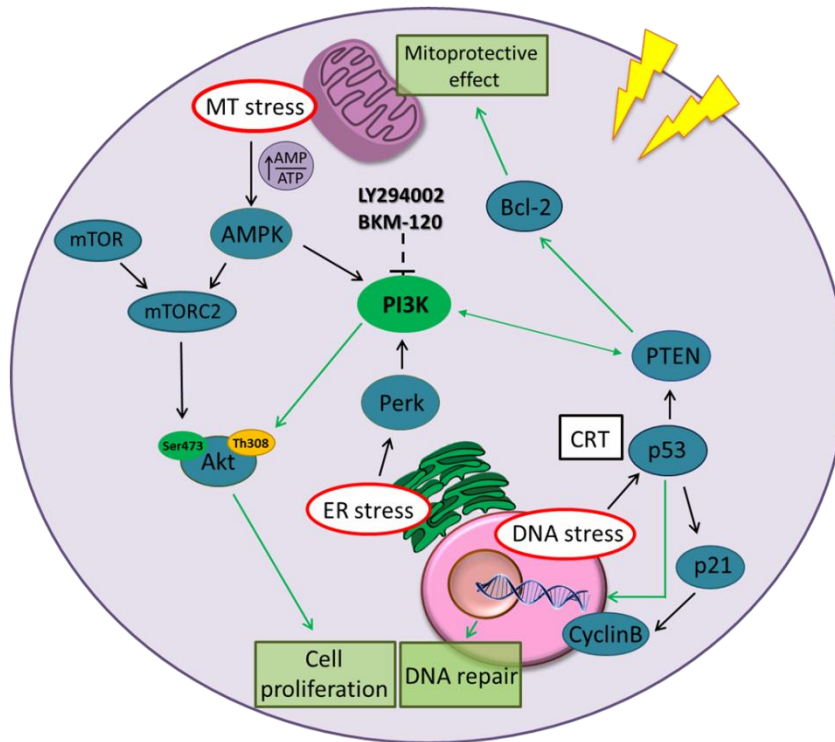
## Výsledky

H522 a H460 v přítomnosti inhibitoru LY294002 s následnou aplikací cisplatiny vede ke zvýšenému přežívání.

Výše popsaný benefit přežívání vybraných nádorových buněčných linií s částečnou inhibicí PI3K (LY294002, 20  $\mu$ M a 50  $\mu$ M) a následnou aplikací intenzivní hypertermie (47 °C) se odráží v rozdílných hladinách exprese proteinu GADD34, jehož amplifikace je indukována poškozením DNA. Dále je analyzována hladina exprese chaperonu BiP, který je indukovaný vlivem stresu endoplazmatického retikula (Obr. 37).



Obr. 38: Analýza qPCR exprese proteinů účastnících se odpovědi na poškození DNA a stresu endoplazmatického retikula. GADD34 a BiP reagují na poškození DNA a stres endoplazmatického retikula svojí amplifikací. Byla analyzována exprese těchto proteinů u nádorových buněčných linií A549, H460 a H522 po aplikaci inhibitoru LY294002 a následném ošetření hypertermií.



Obr. 39: Schéma signálních drah navržené na základě výsledků výše uvedených experimentů. Stres endoplazmatického retikula vyvolává aktivaci Perk a v součinnosti s AMPK aktivovanou v důsledku úniku ATP do extracelulárního prostoru vyvolává fosforylaci PI3K. Následně dochází k fosforylaci Akt (Thr308) a aktivaci záchranných buněčných mechanismů. Pro plnou aktivitu Akt je rovněž nutná přítomnost fosforylace Akt (Ser473), stimulovaná aktivitou mTORC2, který je aktivován skrze mitochondriální poškození a následnou fosforylaci AMPK. Podstatnou je rovněž interakce mezi PTEN a proteinem p53, jehož aktivita je důležitá pro opravy poškozené DNA termorezistenci. PTEN relokuluje z jadra do cytosolu, kde fosforyluje Bcl-2, jehož následná inaktivace vede k mitoprotektivnímu efektu. Významná je i skutečnost, že samotná aplikace vybraných inhibitorů PI3K vyvolává inhibici buněčného cyklu a pravděpodobně dává nádorovým buňkám výhodu vhodného výchozího bodu pro energeticky výhodnější opravy poškozené DNA:



## 6 Diskuze

Již od Hippokratových dob byla po tisíce let hypertermie vyvolaná horečkou na pozadí infekčního onemocnění používána k léčbě mnoha typů onemocnění včetně rakoviny (Hobohm et al., 2005). Jediným významným problémem byla nemožnost cílené aplikace vyšších než hraničně fyziologických teplot, která by umožňovala eliminaci solidních nádorů *in situ*. Průlomovým byl v podstatě až objev a použití magnetických nanopartikulí injikovaných přímo do oblasti nádorové tkáně s následnou regulovatelnou hladinou použitého tepla v důsledku indukce magnetického vlnění radiofrekvencí (Pissuwan et al., 2006; Ito et al., 2006). Nehledě na tyto pokroky v praktickém použití, zůstávala hypertermie z pohledu znalosti buněčně biologických procesů a jejich regulace dlouhou dobu značně opomíjena.

V posledních dvou desetiletích byl definován pojem termální dávky vyjadřující množství tepelné energie, které je vystaven cílový objekt, definované jeho intenzitou a délkou jeho trvání (Mouratidis et al., 2015). V případě buněk lidské tkáně, nebo nádorů z nich odvozených musí být jejich původ zavzat do úvahy nad výsledným stanovením termální dávky vzhledem k výrazně odlišné citlivosti některých z nich. Rovněž byly podrobně popsány mnohé děje, k jejichž aktivaci dochází s postupně se rozvíjející odpovědí na působící hypertermický stresový podnět. Mezi tyto děje patří zejména uvolnění ATP do extracelulárního prostoru buňky v důsledku kolapsu vnější mitochondriální membrány, provázené přítomností molekul SMAC/Diablo a cytochromu c v cytosolu a následnou aktivací vnitřní apoptotické kaskády řízené aktivitou iniciační kaspázy 9. Dále pak stresová odpověď endoplazmatického retikula, která zahrnuje uvolnění vápníkových rezerv do cytosolu, doprovázené aktivací vápníkem-regulovaných signálních drah, aktivací kaspázy 4, stresových proteinů (PERK, BiP, ATF6, IRE1 $\alpha$ ) a zvýšením hladiny molekulárních chaperonů (např. proteiny teplotního šoku, kalretikulin). Paralelně dochází vlivem PERK-indukované fosforylace EIF-2 $\alpha$  k utlumení aktivity translačního aparátu a k aktivaci makroautofagie (Milleron a Bratton, 2007).

U buněčné linie A549 lidského adenokarcinomu plic jsme v předešlé studii ustanovili teplotu intenzivní hypertermie (47 °C), při níž jsme schopni v dostatečně dlouhém časovém úseku (až 24h po aplikaci stresového podnětu) pozorovat rozvoj

## Diskuze

všech výše uvedených znaků teplem indukované buněčné smrti (viz Obr. 21) (Adkins et al., manuskript v revizi do žurnálu Cancer Research).

Paralelně dochází k iniciaci signalizačních drah řízených aktivitou PI3/Akt/mTOR a umožňujících skrze složitou síť vnitrobuněčných mechanismů spuštění záchranných procesů ve snaze buňky o přežití. Výsledný efekt stresového podnětu na buňku je kritickým způsobem závislý na fázi buněčného cyklu, ve které se buňka nachází. Nejvíce citlivé jsou buňky v mitotické fázi (následná neúčinná mitóza) a S fázi (možnost vzniku chromozomálního poškození) naproti tomu za nejméně citlivé jsou považovány buňky v G1 fázi (Hildebrandt et al., 2002). Téměř okamžitě po začátku působení hypertermie o teplotě vyšší než nefyziologické dochází k inaktivaci cyklin-dependentních kináz a na ně navázaných efektorových proteinů (cyklin B1, survivin a další) a zástavě buněčného cyklu v jednom z možných kontrolních bodů (G1/S, či G2/M, respektive). V regulaci buněčného cyklu hraje významnou roli i aktivita proteinu p53 a to v rozsahu odpovídajícím míře poškození DNA. V případě menšího poškození DNA protein p53 podpoří zástavu buněčného cyklu a opravu poškozené DNA, zatímco v případě rozsáhlého poškození aktivuje apoptotickou dráhu (Chen et al., 1996). Kinázy Chk1 a Chk2 se pak jednak podílejí na stabilizaci proteinu p53, ale zejména inhibují funkci fosfatáz cdc25A a cdc25C zodpovědných za průchod přes G1/S a G2/M kontrolní body a zabraňují tak progresi buněčného cyklu.

V naší práci jsme po aplikaci intenzivní hypertermie pozorovali aktivaci PI3K s následnou fosforylací Akt na aminokyselinových zbytcích Thr308 působením PDK-1 a Ser473 po aktivaci mTORC2. K aktivaci PI3K dochází v důsledku aktivace PERK a AMPK po stresu endoplazmatického retikula a změny intracelulárního poměru ATP/AMP, respektive (viz Obr. 15). Jak zde bylo ukázáno v experimentech s PERK  $-/-$  OV90 nádorovou buněčnou linií, je signál PI3K vyvolaný fosforylací PERK na aminokyselinovém zbytku Thr980 významný pro zachování přežívání nádorových buněk po ošetření intenzivní hypertermií v přítomnosti inhibitoru PI3K – viz dále (viz Obr. 23).

Tato práce je založena na pozorování účinku vybraných inhibitorů právě PI3K (LY294002 a BKM120), které v suboptimálních koncentracích (zachovaná fosforylace PI3K na aminokyselinovém zbytku Ser473) mají schopnost antagonizovat účinek aplikované intenzivní hypertermie a umožnit vyšší přežívání nádorových buněk ve srovnání s hypertermií samotnou (viz Obr. 25).



## Diskuze

Mnohé zcela nové typy sloučenin jsou v současné době testovány v různých fázích klinických zkoušek na pacientech napříč různými typy nádorových onemocnění. Rovněž nízkomolekulární inhibitory PI3K se díky lepší specificitě nové generace těchto léčiv jeví jako molekuly s významným terapeutickým potenciálem. A to zejména proto, že bazální hladina signalizace v ose PI3K/Akt/mTOR je výrazně zvýšena až v 50 % pacientů např. s rakovinou prostaty. Změny v bazálních hladinách PI3K/Akt/mTOR odlišují zdravé buňky od nádorových a mají rovněž prognostický význam v predikci dalšího vývoje nádorového onemocnění, neboť jsou asociovány s agresivitou tumoru a rizikem biochemického relapsu (Morgan et al., 2009). Na trhu však vzhledem k mnohým selháním v klinických studiích existuje pouze nedávno schválený PI3K inhibitor idelalisib (r. 2014, Zydelig, produkt společnosti Gilead Sciences) určený pro léčbu chronické lymfocytární leukémie v kombinaci s rituximabem (Furman et al., 2014). Je zřejmé, že hlubší porozumění molekulárním mechanismům regulace signalizace v ose PI3K/Akt/mTOR by mohlo umožnit porozumnět nejen příčinám selháním PI3K inhibitorů v léčbě nádorových onemocnění, ale mohlo by vést k rozvoji zcela nových strategií v této oblasti. Velká pozornost je v současnosti věnována rovněž studiu molekuly PTEN, tedy přirozeného inhibitoru PI3K a jeho působení na protein p53 (viz dále).

Bylo popsáno, že PTEN se přítomen zejména v cytosolu, kde funguje jako lipidová fosfatáza negativně regulující PI3K/Akt. PTEN se ale může u diferencovaných buněk, nebo buněk v klidové fázi (G0, či buňky se zástavou buněčného cyklu) vyskytovat rovněž v jádře, kde dochází k jeho vazbě na p53, čímž reguluje hladinu a transkripční aktivitu tohoto proteinu. V případě, že je dojde v buňce k rozvoji oxidativního stresu, je znemožněna relokace PTEN do cytosolu (proces závislý na fosforylaci jeho aminokyselinového zbytku Ser380). Následně dochází k p53-indukované zástavě buněčného cyklu v G1-fázi a redukci produkce ROS (Chang et al., 2008). Některé výsledky poukazují na skutečnost, že nukleární lokalizace PTEN je regulována součinností několika faktorů, mimo jiné i zpětnovazebnou regulací skrze hladiny PI3K. Přechod PTEN z jádra do cytosolu pak rovněž provází uvolnění buněk z blokády v G0/G1 fázi do G1/S fáze (Liu et al., 2007).

S použitím konfokální mikroskopie a qPCR jsme ukázali, že po vystavení buněk intenzivní hypertermii dochází během 30 minut po ohřevu k amplifikaci PTEN a jeho retenci v jádře buňky. V případě buněk ošetřených oběma zde používanými inhibitory PI3K dochází ještě před ohřevem ke změnám ve vnitrobuněčné distribuci PTEN a

## Diskuze

poklesu jeho hladiny (viz Obr. 31 a 32). Dochází rovněž k nabohacení p53 a její relokalizace do cytosolu buňky (viz Obr. 33).

Na základě uvedených pozorování je pravděpodobné, že nejen specifické hladiny PI3K, PTEN a p53, ale i lokalizace posledních dvou je nezbytným parametrem umožňujícím dosažení dlouhodobého přežití nádorových buněk.

Tuto skutečnost jsme prokázali i v experimentech s nádorovými liniemi vykazujícími deficit buď na straně PTEN při zachované funkci p53 (LNCap, siPTEN A549), či p53 při zachované funkci PTEN (SK-MES-1). Kdy u žádné z uvedených linií nebylo možné dosáhnout přežití buněk po jejich vystavení hypertermii v přítomnosti inhibitorů PI3K (viz Obr. 29, 32). V případě SK-MES-1 může hrát významnou roli jeden ze známých protektivních mechanismů proteinu p53, kterým je jeho schopnost indukovat přes aktivaci proteinu p21 zástavu buněčného cyklu v G2 fázi a umožnit tak opravu poškozené DNA. Ačkoli buňky bez proteinu p53 jsou schopny po poškození DNA vyvolat zástavu buněčného cyklu, tato zástava obvykle není dostatečně dlouhá a vede k předčasnému vstupu buněk do mitózy, což ústí v buněčnou smrt (Chen et al., 1996). Stejně tak byť ze zcela jiného důvodu nebylo možné dosáhnout přežití buněk při současné inhibici makroautofagie (překročení únosné hladiny stresu akumulací denaturovaných proteinů) a bloádou mTORC2 aktivace vedoucí k eliminaci fosforylace na Ser473 – viz dále.

Makroautofagie, často nazývaná pouze autofagie, je procesem, kdy dochází k odbourávání intracelulárních organel a nadbytečných proteinů jejich vakuolizací s následnou lysozomální degradací. Tento děj umožňuje získávat buňce nové zdroje energie a to zejména za nepříznivých podmínek (hladovění, působení stresu apod.). Bazální nastavení rychlosti autofagického aparátu je striktně regulováno, mimo jiné též prostřednictvím proteinů zapojených do řízení vstupu do apoptózy (např. proteiny z rodiny Bcl-2). Z řady pozorování se zdá být zřejmé, že autofagie může za určitých okolností (např. přílišná hladina stresu) vést ke smrti buňky, zatímco za jiných podmínek je jedním ze stěžejních mechanismů přežití (Galluzzi et al., 2008). Stejně tak je tomu i v případě aplikace hypertermie na nádorové buňky, kdy se schopnost odstraňovat denaturované proteiny hromadící se v cytosolu buňky stává kritickým parametrem rozhodujícím o přežití zasažené buňky.

Z experimentů s přidavkem inhibitoru mTORC2 torinu-1 k buňkám A549 v kombinaci s hypertermií po provedené preinkubaci s LY294002 jasně vyplynulo, že význam zachování fosforylace Akt na aminokyselinovém zbytku Ser473 je naprosto

## Diskuze

kritický pro přežití nádorových buněk (Obr. 35). Nicméně, ani použití tzv. duálních inhibitorů PI3K a mTOR nezaznamenalo v klinických testech významný úspěch (Sabbah et al., 2011). V kontextu výše uvedeného se nabízí myšlenka, zda díky dokonale vyrovnanému zpětnovazebnému regulačnímu mechanismu mezi PI3K/Akt/mTOR a potažmo PTEN a p53, lze vůbec alespoň v určitém procentu pacientů dosáhnout trvalejšího účinku terapie s minimálním rizikem výskytu toxických efektů v důsledku podání příliš vysokých dávek použitých inhibitorů. Zejména pochybnosti v tomto ohledu vedly k zavedení kombinované terapie s použitím inhibitorů PI3K/Akt/mTOR a vybraných chemoterapeutik. Jedním z nejčastěji používaných preparátů v terapiirůzných typů nádorů je cisplatina.

Cisplatina je jedním z nejúčinnějších a nejběžněji používaných cytostatik v léčbě řady karcinomů, zejména karcinomů varlat, ovaria, hlavy, krku, močového měchýře a malobuněčného karcinomu plic. Jedná se o celkem jednoduchou anorganickou sloučeninu – [cisPt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], tedy cisdiamino-dichlor platnatý komplex, řadící se mezi tzv. alkylační cytostatika. Hlavní mechanismus protinádorového účinku cisplatiny spočívá v její interakci s DNA a v tvorbě kovalentních vazeb s purinovými bázemi, nejčastěji s guaninem. Vzniklé kovalentní vazby mezi řetězcí brání jejich separaci při replikaci a zároveň dochází k inhibici transkripce.

Ošetření cisplatinou vyvolává transkripci genu pro protein p21, který působí jako inhibitor cyklín dependentních kináz Cdk2 a Cdk4, a evokuje tak zástavu buněčného cyklu. Dále protein p53 indukuje expresi proapoptotických členů rodiny Bcl-2, jako jsou Bax, Puma a Noxa, které jsou odpovědné za spuštění mitochondriální apoptotické dráhy (Kuwahara et al., 2000). Signální drahou proteinu p53 může dojít i k inhibici stresové JNK kinázy, která se podílí na indukci apoptózy, což vede také k ochraně buňky před apoptózou. Pro většinu buněčných linií vystavených působení cisplatiny je charakteristická zástava buněčného cyklu v G2 fázi, významná akumulace buněk v G1 fázi se vyskytuje velmi zřídka (Sorenson et al., 1988). Výše uvedené poznatky poskytují jistou naději na úspěch kombinované terapie PI3K/Akt/mTOR a cisplatiny.

Z našich poznatků nicméně vyplývá, že za určitých okolností může přídavek inhibitoru PI3K antagonizovat rovněž účinky ošetření cisplatinou, jak bylo ukázáno na nárůstu dlouhodobého přežití buněk linií plicního adenokarcinomu H522 a H460 (Obr. 37). V případě těchto linií narozdíl od linie A549 nebyl antagonizující účinek dosažen

## Diskuze

v kombinaci s hypertermií, ale pouze s ošetřením cisplatinou. Všechny uvedené linie byly vybrány cíleně, protože mají funkční p53 i PTEN. Tento výsledek by pak mohl být zapříčiněn různými hladinami exprese PTEN, které jsou uvedeny v literatuře (Jung et al., 2010).

Závěrem je tedy možné shrnout, že možnosti použití inhibitorů hlavních komponent v ose PI3K/Akt/mTOR se ve světle prezentovaných výsledků a v kontextu s klinickými daty zdají být oproti původním předpokladům poměrně omezené. Nalezení specifických biomarkerů by mohlo výrazně napomoci úspěchu tohoto typu léčby a to zejména v nastavení dávky a monitorování průběhu vlastní terapie.

## 7 Závěr

1.) Na základě charakterizace stresové odpovědi buněk ošetřených definovanou termální dávkou bylo zjištěno, že dochází k aktivaci signálních drah vedoucí k buněčné smrti zejména v důsledku úbytku energetických zásob, akumulace denaturovaných proteinů v cytosolu buňky a nevratného poškození DNA. Toto pozorování je založeno na níže uvedených výsledcích:

- Hypertermie indukuje únik ATP do extracelulárního prostoru. V důsledku stresové odpovědi endoplazmatického retikula dochází k aktivaci kaspáz, úniku vápníku do cytosolu a fosforylaci PERK. Paralelně dochází k poklesu mitochondriálního potenciálu provázeného únikem cytochromu c do cytosolu a amplifikaci ROS. Vitální stav buňky odráží přítomnost molekuly kalretikulinu na povrchu buněk.
- V důsledku změn poměru ATP/AMP a stresu endoplazmatického retikula dochází k aktivaci PI3K s následnou iniciací záchranných mechanismů buněk vystavených působení hypertermie. Aktivace vybraných komponent signálních drah regulovaných PI3K byly analyzovány metodou western blot (PERK, PTEN, p53, mTOR, Akt, Erk1/2, Bad).

2.) V rámci zhodnocení vlivu vybraných inhibitorů PI3K na přežívání nádorových buněčných linií po aplikaci hypertermie bylo zjištěno, že částečná inhibice PI3K se zachovanou aktivitou na Akt (fosforylace na aminokyselinovém zbytku Ser473) v rozporu s očekáváním antagonizuje protinádorový efekt hypertermie u širokého spektra nádorových linií. U některých nádorových buněčných linií navíc dokonce podporuje jejich přežívání.

- Inhibitory PI3K (LY294002 a BKM120) o stanovené koncentraci byly titrovány na základě inhibičního efektu na fosforylaci Akt (Thr308, Ser473). Význam aktivity mTOR na zachování aktivity Akt (Ser473) byl prokázán inhibicí (rapamycin, torin) jeho komplexů, mTORC1 a mTORC2.
- K přežívání nádorových buněk po částečné inhibici PI3K přispívá snížení hladiny stresu vlivem aktivity PTEN a p53. Dochází ke změně jejich subcelulární lokalizace vedoucí k zastavení buněčného cyklu, snížení hladiny oxidativního stresu a aktivaci anti-apoptotických proteinů z rodiny Bcl. PTEN

## Závěr

má zásadní roli v dlouhodobém přežívání nádorových buněčných linií po aplikaci hypertermie v kombinaci s částečnou inhibicí PI3K.

- Buňky izolované z primárního nádoru nebylo možné vzhledem k jejich nízkému počtu použít pro sledování efektu vybraného klinicky používaného inhibitoru PI3K.

3.) Částečná inhibice aktivity PI3K v kombinaci s běžně klinicky používanými chemoterapeutiky rovněž vede podobně jako v případě hypertermie u některých nádorových buněčných linií k jejich zvýšenému přežívání a to v závislosti na intracelulárních hladinách molekul p53 a PTEN.

## 8 Seznam literatury

Ahmed, K., & Zaidi, S. F. (2013). Treating cancer with heat: Hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis. *Journal of the Pakistan Medical Association*.

Badadani, M. (2012). Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. *ISRN Cell Biology*, 2012(2), 1–11. <http://doi.org/10.5402/2012/927064>.

Bettaieb, A., & Averill-Bates, D. A. (2015). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(1), 52–62. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.016>.

Bettaieb, A., Paulina, K., Diana A. Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. InTech, 2013 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.5772/55795. ISBN 978-953-51-1098-9.

Blanco R, Iwakawa R, Tang M *et al* A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Hum Mutat* 2009; 30: 1199–206.

Brada, M., Ford, D., Ashley, S., Bliss, J. M., Crowley, S., Mason, M., Rajan, B., & Traish, D. (1992). Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *BMJ*, 304(6838), 1343-1346.

Courtney, K. D., Corcoran, R. B., & Engelman, J. A. (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(6), 1075–83. <http://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.3641>.

Dancey J. E. (2004). Molecular targeting: PI3 kinase pathway. *Ann. Oncol.* 15, iv233–iv239. [10.1093/annonc/mdh932](http://doi.org/10.1093/annonc/mdh932).

Datta, S. R., Dudek, H., Xu, T., Masters, S., Haian, F., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2), 231–241. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80405-5](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5).

## Seznam literatury

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., Nelson, D. A., Jin, S., and White, E., 2006: Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10(1): 51-64.

Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol.*2008;4:313–321. doi: 10.1038/nchembio.83.

Delaney, G. et al. (2005). The Role of Radiotherapy in Cancer Treatment: Estimating Optimal Utilization from a Review of Evidence-Based Clinical Guidelines. *Cancer*, 104(6), S. 1129–1137. <http://doi.org/10.1002/cncr.21324>.

Donehower, L.A. (1996). The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Semin. Cancer Biol.* 7, 269-278.

Edinger AL, Thompson CB. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.*2004;16:663–669. doi: 10.1016/j.ceb.2004.09.011.

Engelman, J. A., Luo, J., Cantley, L. C. (2006): The evolution of phosphatidylinositol 3 kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7: 606–19.

Faes, S., & Dormond, O. (2015). PI3K and AKT: Unfaithful partners in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. <http://doi.org/10.3390/ijms160921138>.

Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., and Weissman, A.M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945-8951.

Feng J., Park J., Cron P., Hess D., and Hemmings B.A. 2004. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 279: 41189-96.

Fučíková, J., Bartůňková, J., Špišek, R. The Concept of Immunogenic Cell Death in Antitumor Immunity. *Klinická onkologie* [online]. 2015, 28(Suppl 4), 4S48-4S55 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.14735/amko20154S48. ISSN 0862495x. Dostupné z:



Seznam literatury

<http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4842/>.

Furman RR1, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370:997–1007.

Galluzzi L, Morselli E, Vicencio JM, Kepp O, Joza N, Tajeddine N, et al. Life, death and burial: multifaceted impact of autophagy. *Biochem Soc Trans*. 2008;36:786–790. doi: 10.1042/BST0360786.

Galluzzi, L., Blomgren, K., & Kroemer, G. (2009). Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(7), 481–494. <http://doi.org/10.1038/nrn2665>.

Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F, Kozma SC, Thomas AP, Thomas G. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca<sup>2+</sup>/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab*. 2008;7(5):456–465.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

Hennessy B. T., Smith D. L., Ram P. T., Lu Y. & Mills G. B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 4, 988–1004, (2005).10.1038/nrd1902.

Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., ... Riess, H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. [http://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00179-2](http://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00179-2).

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 2009;20:1981–1991. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1248.

Hou, C.-H., Lin, F.-L., Hou, S.-M., & Liu, J.-F. (2014). Hyperthermia Induces Apoptosis through Endoplasmic Reticulum and Reactive Oxygen Species in Human

## Seznam literatury

Osteosarcoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 17380–17395. <http://doi.org/10.3390/ijms151017380>.

Chang CJ, Mulholland DJ, Valamehr B, Mosessian S, Sellers WR, Wu H. PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. *Mol Cell Biol*.2008;28(10):3281–3289. doi: 10.1128/MCB.00310-08.

Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels, functional domains and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev*. 1996;10:2438–2451. doi: 10.1101/gad.10.19.2438.

Chicheł, A., Skowronek, J., Kubaszewska, M., & Kanikowski, M. (2007). Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 12(5), 267–275. [http://doi.org/10.1016/S1507-1367\(10\)60065-X](http://doi.org/10.1016/S1507-1367(10)60065-X).

Jiang, L., Sheikh, M. S., & Huang, Y. (2010). Decision Making by p53: Life versus Death. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 2(2), 69–77. <http://doi.org/10.4255/mcpharmacol.10.10>.

Jung IL, Kang HJ, Kim KC, Kim IG. PTEN/pAkt/p53 signaling pathway correlates with the radioresponse of non-small cell lung cancer. *Int J Mol Med*. 2010;25(4):517–23. Epub 2010/03/04.

Katso R., Okkenhaug K., Ahmadi K., White S., Timms J., Waterfield M. D. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, immunity, homeostasis, and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2001;17:615–675. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.615.

Kepp, O., Galluzzi, L., Martins, I., Schlemmer, F., Adjemian, S., Michaud, M., ... Kroemer, G. (2011). Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(1), 61–69. <http://doi.org/10.1007/s10555-011-9273-4>.

## Seznam literatury

Koido, S., Ohkusa, T., Homma, S., Namiki, Y., Takakura, K., Saito, K., ... Tajiri, H. (2013). Immunotherapy for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 19(46), 8531–8542. <http://doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8531>.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 51–72. <http://doi.org/doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100008>.

Kroemer, G., Marino, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>.

Kuwahara D, Tsutsumi K, Kobayashi T, Hasunuma T, Nishioka K. Caspase-9 regulates cisplatin-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2000;148:65–71. doi: 10.1016/S0304-3835(99)00315-8.

Liu JL, Mao Z, LaFortune TA, Alonso MM, Gallick GE, Fueyo J, Yung WKA. Cell cycle-dependent nuclear export of phosphatase and tensin homologue tumor suppressor is regulated by the phosphoinositide-3-kinase signaling cascade. *Cancer research*. 2007;67:11054–11063.

Liu P, Gan W, Inuzuka H, Lazorchak AS, Gao D, Arojo O, et al. Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat Cell Biol*(2013) 15:1340–50. [10.1038/ncb2860](https://doi.org/10.1038/ncb2860).

Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*. 2002;10:457–468. doi: [10.1016/S1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00636-6).

Mallory, M., Gogineni, E., Jones, G. C., Greer, L., & Simone, C. B. (2016). Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.003>.

Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(2), 81–94. <http://doi.org/10.1038/nrm3735>.

## Seznam literatury

Martins, F. C., & de Oliveira, C. F. (2008). Chemotherapy and the future: microdialysis as a local administration technique. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 30(1), 5-8.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7(12), 961–7. <http://doi.org/10.1038/nrc2254>.

Mesaeli, N., & Phillipson, C. (2004). Impaired p53 expression, function, and nuclear localization in calreticulin-deficient cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15(4), 1862–1870. <http://doi.org/10.1091/mbc.E03>.

Miller, D. L., Smith, N. B., Bailey, M. R., Czarnota, G. J., Hynynen, K., & Makin, I. R. S. (2012). Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *Journal of Ultrasound in Medicine : Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, 31(4), 623–34. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.

Mocna, M. (2007). Hyperthermia in oncology. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 958, pp. 256–257). <http://doi.org/10.1063/1.2825805>.

Morgan TM, Koreckij TD, Corey E.. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr Cancer Drug Targets* (2009) 9:237–49. [10.2174/156800909787580999](http://doi.org/10.2174/156800909787580999)

Mouratidis, P. X. E., Rivens, I., & ter Haar, G. (2015). A study of thermal dose-induced autophagy, apoptosis and necroptosis in colon cancer cells. *International Journal of Hyperthermia*, 31(5), 476–488. <http://doi.org/10.3109/02656736.2015.1029995>.

Ohnishi, K., Yasumoto, J. I., Takahashi, A., & Ohnishi, T. (2006). LY294002, an inhibitor of PI-3K, enhances heat sensitivity independently of p53 status in human lung cancer cells. *International Journal of Oncology*, 29(1), 249–253.

Plácido A. I., Pereira C. M. F., Duarte A. I., Candeias E., Correia S. C., Santos R. X., et al. (2014). The role of endoplasmic reticulum in amyloid precursor protein processing and trafficking: implications for Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1842 1444–1453. [10.1016/j.bbadis.2014.05.003](http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.003).

## Seznam literatury

Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G. & Gabai V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 283, 1–16 (2003).

Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in autophagy. *Experimental & molecular medicine.* 2012;44(2):73–80. doi: 10.3858/emm.2012.44.2.029.

Roti Roti, J. L. (2008). Cellular responses to hyperthermia (40-46°C): Cell killing and molecular events. *International Journal of Hyperthermia*, 24(1), 3–15. <http://doi.org/10.1080/02656730701769841>.

Sabbah D. A.; Brattain M. G.; Zhong H. Dual inhibitors of PI3K/mTOR or mTOR-selective inhibitors: which way shall we go?. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18, 5528–5534.

Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., Tsumagari, K., Murakami, T., Cavener, D. R., & Imaizumi, K. (2011). Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(alpha)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4809–18. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.152900>.

Sarbassov D. D., Guertin D. A., Ali S. M. & Sabatini D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101 (2005).

Sarker, D., Reid, A. H. M., Yap, T. a, & de Bono, J. S. (2009). Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(15), 4799–805. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0125>.

Sebag-Montefiore, D., Stephens, R. J., Steele, R., Monson, J., Grieve, R., Khanna, S., ... Parmar, M. (2009). Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. *The Lancet*, 373(9666), 811–820. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60484-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60484-0).

Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M., & Arakawa, S. (2014). Autophagic cell death and cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* <http://doi.org/10.3390/ijms15023145>.

## Seznam literatury

Sorenson CM, Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 1988;48:4484–4488.

Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., ... Mak, T. W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Molecular Cell*, 8(2), 317–325. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00323-9](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00323-9).

Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):231–241.

Thiesen, B., & Jordan, A. (2008). Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia : The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 24(6), 467–474. <http://doi.org/10.1080/02656730802104757>.

Thomas C.C., Deak M., Alessi D.R., and van Aalten D.M. 2002. High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol.* 2002 12:1256-62.

Toraya-Brown, S., & Fiering, S. (2014). Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. *International Journal of Hyperthermia*, 30(8), 531–539. <http://doi.org/10.3109/02656736.2014.968640> .

Upreti M, Chu R, Galitovskaya E, Smart SK, Chambers TC. Key role for Bak activation and Bak-Bax interaction in the apoptotic response to vinblastine. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:2224–2232.

Van der Zee, J. (2002). Heating the patient: A promising approach? *Annals of Oncology.* <http://doi.org/10.1093/annonc/mdf280>.

Van der Zee, J., Z., V., M., K., & T., S. (2008). The Kadota Fund International Forum 2004 - Clinical group consensus. *International Journal of Hyperthermia.* <http://doi.org/10.1080/02656730801895058>.

## Seznam literatury

Vansteenkiste J, Canon JL, De Braud F, et al. Safety and efficacy of buparlisib (BKM120) in patients with PI3K pathway-activated non-small cell lung cancer (NSCLC): results from the phase II BASALT-1 study. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1319–1327.

Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., ... Schlag, P. M. (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology*, 3(8), 487–497. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00818-5](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00818-5).

Xu, X., Gupta, S., Hu, W., McGrath, B. C., & Cavener, D. R. (2011). Hyperthermia induces the ER stress pathway. *PLoS ONE*, 6(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0023740>.

Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology.* 2010 Apr;22:124.

Yu L. et al. . Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465, 942–946 (2010).

## Internetové zdroje

<http://media.cellsignal.com/www/pdfs/science/pathways/Autophagy.pdf>.

<http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=science-pathways-akt>.

## Seznam literatury