Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

Propojení buněčné signalizace a metabolismu v nádorových buňkách.

Interplay between cellular signaling and metabolism in cancer cells.

Diplomová práce

Bc. Romana Záhumenská

Vedoucí práce: Mgr. Karel Vališ, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením školitele Mgr. Karla Vališe, Ph.D. s využitím uvedené odborné literatury a dalších informačních zdrojů a neporušila jsem autorská práva.

V Praze dne: .....

Romana Záhumenská

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Karlovi Vališovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, metodickou pomoc, cenné rady, čas a trpělivost, které mi byly nápomocny při tvorbě diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala kamarádce Ladě Grabovské za korekturu českého jazyka a v neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a nejbližším, kteří mne podporovali v průběhu celého studia.

Abstrakt

Hippo signální dráha představuje univerzální mechanismus regulace velikosti orgánů během vývoje, který je konzervován v celé metazoické říši. Komponenty Hippo signální dráhy byly také identifikovány jako důležité tumorsupresory, které fosforylačně inhibují aktivitu onkogenních faktorů a signálních drah (např. YAP/TAZ, PI3K nebo mTOR). MST1 kinasa je součástí centrálního proteinového komplexu Hippo signální dráhy a její aktivace hraje zásadní úlohu během působení mnoha protinádorových léčiv. V naší laboratoři jsme popsali aktivaci MST1 kinasy v leukemických buňkách pomocí přírodních látek, což vedlo k inhibici proliferace a následné indukci apoptosy v těchto buňkách. Shikonin představuje přírodní naftochinon izolovaný z rostliny *Lithospermum erythrorhizon*, který působí v lidských buňkách jako inhibitor glykolysy a mitochondriálního respiračního řetězce. Shikonin indukuje v leukemických buňkách rychlou aktivaci MST1 proteinu, ale mechanizmus této aktivace zůstává neznámý. Z toho důvodu jsme se rozhodli charakterizovat posttranslační modifikace MST1 kinasy během působení shikoninu na leukemické buňky. Nejdříve jsme izolovali MST1 kinasu z kontrolních buněk a buněk vystavených shikoninu pomocí imunoprecipitace. Dále jsme charakterizovali posttranslační modifikace MST1 proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie. Tímto přístupem jsme zjistili, že shikonin indukuje fosforylaci S43, S414 a defosforylaci S438 MST1 proteinu. To může být důsledek inhibice mTORC2 signální dráhy a aktivace ERK signální dráhy jakožto důsledek působení shikoninu na leukemické buňky. Inhibice/aktivace těchto signálních drah byla dále prokázána metodou elektropřenosu proteinů na nitrocelulosovou membránu s následnou imunodetekcí.

Klíčová slova: MST1 kinasa, Shikonin, Hippo signální dráha, metabolismus, leukemie

Abstract

Hippo signaling pathway represents organ size control mechanism constrained between all metazoans. Individual components of the Hippo signaling pathway were identified as key tumor-suppressors which phosphorylate and inhibit activity of several oncogenic factors and signaling pathways (such as YAP/TAZ, PI3K and mTOR). MST1 kinase is a part of central protein complex of the Hippo signaling pathway and its activation is involved in anti-cancer activity of several drugs. We have demonstrated activation of the MST1 kinase by natural compounds in leukemic cells followed by inhibition of proliferation and induction of apoptosis. Shikonin represents natural naphthoquinonic compound isolated from *Lithospermum erythrorhizon* which acts as inhibitor of glycolysis and mitochondrial respiratory chain in human cells. Shikonin induces fast activation of the MST1 protein in leukemic cells however mechanism of this activation remains unknown. Therefore, we tried to characterize posttranslational modifications of the MST1 kinase during shikonin treatment of leukemic cells. Firstly, we isolated MST1 kinase from control and shikonin-treated cells using immunoprecipitation. Then we characterized posttranslational modifications of the MST1 protein employing mass spectrometry. Using this approach we found out phosphorylation of S43, S414 and dephosphorylation of S438 induced by shikonin in leukemic cells. These shikonin-induced changes in phosphorylation of the MST1 may represent inhibition of mTORC2 signaling pathway and activation of ERK signaling pathway. Inhibition/activation of these pathway was confirmed also using immunoblot technique.

(In Czech)

Keywords: MST1 kinase, Shikonin, Hippo signaling pathway, metabolism, leukemia

Obsah

Seznam použitých zkratek ... 8

1. Úvod ... 13

2. Kancerogenese a metabolismus nádorových buněk ... 15

2.1. Metabolismus nádorových buněk ... 17

2.2. Metabolismus sacharidů v nádorových buňkách ... 18

2.3. Metabolismus glutaminu v nádorových buňkách ... 20

2.4. Metabolismus aminokyselin a proteinů v nádorových buňkách ... 20

2.5. Metabolismus lipidů v nádorových buňkách ... 21

3. Signální dráhy v nádorových buňkách ... 22

3.1. RAS/RAF/MEK/ERK signální dráha ... 22

3.1.1. Průběh a komponenty RAS/RAF/MEK/ERK signální kaskády ... 23

3.1.2. Vliv dráhy na progresi buněčného růstu, proliferaci, apoptosu a rakovinu ... 26

3.2. Hippo signální dráha ... 28

3.2.1.Propojení Hippo signální dráhy s dráhou synthesy mevalonátu a RHO signalizací 30

3.2.2. Propojení Hippo signální dráhy a metabolismu glukosy ... 33

3.2.3. Regulace AMPK a vliv na Hippo signální dráhu ... 36

3.3. PI3K/ AKT/ mTOR signální dráha ... 37

3.3.1. Signalizace mTOR ... 39

3.3.2. Propojení mTOR signalizace a Hippo signální dráhy ... 42

3.3.3. mTOR signalizace a rakovina ... 43

4. Cíle diplomové práce ... 45

5. Materiál a metody ... 46

5.1. Biologický materiál ... 46

5.2. Přístroje a příslušenství ... 46

5.3. Chemikálie 47
5.4. Postup při sledování vlivu shikoninu na buněčnou signalizaci 50
5.4.1. Kultivace a pasážování rakovinových buněk linie Jurkat 50
5.4.2. Příprava buněčných proteinů 50
5.4.3. Kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů 51
5.4.4. SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza 52
5.4.5. Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu a jejich imunodetekce 54
5.5. Postup imunoprecipitace MST1 proteinu přes Protein PLUS G-Agarosu 56
5.6. Imunoprecipitace MST1 proteinu přes magnetické kuličky 59
5.7. Hmotnostní spektrometrie 64
6. Výsledky 65
6.1. Kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů 65
6.2. Výsledky imunodetekce proteinů 66
6.3. Výsledky imunoprecipitace MST1 kinasy 71
6.4 Výsledky imunoprecipitace přes magnetické kuličky 72
6.5. Výsledky hmotnostní spektrometrie 73
7. Diskuse 75
8. Závěr 77
Seznam použité literatury 78

Seznam použitých zkratek

β-TRCP	z angl. β-transduction repeat containing E3 ubikvitin protein ligase
AK	aminokyseliny
AcetylCoA	acetylkoenzym A
AKT	S/T kinasa
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	z angl. AMP activated protein kinase
AMOTL1	z angl. Angiomotin like1
APAF-1	z angl. Apoptic protease activating factor 1
APS	peroxodisíran amonný, z angl. ammonium persulfate
ATP	adenosintrifosfát
BCA	bicinchoninová kyselina
BAX	pro-apoptický protein rodiny BCL-2
BIM	pro-apoptický protein, z angl. BCL-2-like protein 11
BCL-2	anti-apoptický protein, z angl. B-cell lymphoma 2
BCL-XL	anti-apoptický protein, z angl. B-cell lymphoma-extra large
BSA	hovězí sérový albumin, z angl. Bovine serum albumin
CAD	karbamoylfosfát synthetasa
CCD kamera	z angl. Charge-coupled device camera
CKCA	centrální kinasová kazeta v Hippo signální dráze
CML	chronická myeloidní leukémie
CREB	z angl. Cellular response element binding protein.

DEPTOR	z angl. DEP domain containing mTOR interacting protein
D/Y	aspartát/ tyrosin
DISC	z angl. Death inducing signaling complex
DSM	dráha synthesy mevalonátu
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGFR	receptor na povrchu buněk, z angl. Epidermal growth factor receptor
EJC	komplex exonových spojů
ERK	proteinkinasa, z angl. Extracellular signal regulated kinase
FAD	flavinadenindinukleotid
$FADH_2$	redukovaný flavinadenindinukleotid
FBS	fetální hovězí sérum, z angl. Fetal bovine serum
FDP	farnesyldifosfát
FOXO	transkripční faktory, z angl. Forkhead box proteins
GDP/GTP	guanosindifosfát/guanosintrifosfát
GGDP	geranylgeranyldifosfát
GGT	geranylgeranyltransferasa
GLK	glukosa
G6P	glukosa-6-fosfát
GLUT1/4	glukosový transportér 1/4, z angl. Glucose transporter
GSK-3β	S/T kinasa, z angl. Glycogen synthase kinase 3β
GRB2	z angl. Growth factors receptor- bound protein 2
HMGCoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
HMGCR	HMGCoA reduktasa
HS	hmotnostní spektrometrie

HSD	Hippo signální dráha
ChREBP	z angl. Carbohydrat response element binding protein
IRS1	insulin receptorový substrát
KC	Krebsův cyklus
LATS1/2	S/T kinasy, z angl. large tumor suppressor
LDH	laktatdehydrogenasa
MEK1/2	z angl. Mitogen activated protein kinase/ ERK kinase
MK	mastné kyseliny
MLC-1	anti-apoptický protein rodiny BCL-2
MLX	z angl. Max like protein x
mLST8	z angl. Mammalian lethel with Sec13 protein 8
MOB1A/B	enzym, z angl. MOB kinase aktivator 1A/B
mRNA	mediatorová ribonukleová kyselina
MST1/2	z angl. Mammalian STE20-like protein kinase
mSIN1	regulační podjednotka mTORC2
MTHFD2	z angl. Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/Cyclohydrolase
mTOR	S/T kinasa, z angl. mammalian target of rapamycin
mTORC1	proteinový komplex, z angl. mTOR Complex 1
mTORC2	proteinový komplex, z angl. mTOR Complex 2
NAD^+	nikotinamidadenindinukleotid
$NADH+H^+$	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
$NADPH+H^+$	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NK	z angl. Natural killer cell

NF2	tumorsupresorový protein, z angl. Neurofibromin 2
P53	protein o velikosti 53 kDa
p85	regulační podjednotka
p110	katalytická podjednotka
PAK	z angl. p21 protein kinase
PARKIN	protein součástí E3 ubikvitin ligasy
PBS	fosfátový pufr, z angl. Phosphate buffered saline
PDK1	protein kinasa, z angl. Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PDZ	vazebná doména obsahující 80-90 aminokyselin
PFK1	fosfofruktokinasa 1
PFKFB3	malé molekulové inhibitory
PHD	pyruvatdehydrogenasa
PI3K	z angl. Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIP_2	z angl. Phosphatidyl-inositol -4,5-bisphosphate
PIP_3	z angl. Phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate
PKCα	protein kinasa
PKM1	pyruvatkinasa isoforma 1
PKM2	pyruvakinasa isoforma 2
PP	pyrofosfát
PD	pentosová dráha
PRAS40	z angl. Proline rich Akt substrate of 40 kDa
PTEN	z angl. Phosphatase and tensin homolog
R5P	ribosa-5-fosfát
RAF	z angl. Rapidly accelerated fibrosarcoma

RAS	z angl. Rat sarcoma
RAPTOR	z angl. Regulatory protein associated with mTOR
RKIP	z angl. Raf kinase inhibitory protein
RICTOR	z angl. Rapamycin insentive companion of mTOR
RIPA	lyzační pufr, z angl. Radio immunoprecipitation assay
RR	respirační řetězec
SAV1	z angl. Salvador homologue 1
SDS	dodecylsíran sodný, z angl. Sodium dodecyl sulfate
SGK1	S/T kinasa
SHC	adaptorový protein
SMADs	intracelulární proteiny transdukující extracelulární signály do jádra buňky
SOS	z angl. Son of sevenless
SRC	rodina kinas, z angl. Sarcoma
SREBP1c	transkripční faktor, z angl. Sterol regulatory element binding protein
S/T	serin/threonin
TAZ	protein, z angl. Transcriptional coactivator with a PDZ-binding domain
TCF	transkripční faktory, z angl. T cell factor
TEAD	transkripční faktor, z angl.TEA domain family member
TEMED	N,N,N',N-Tetramethylethylendiamin
TNF	z angl. Tumor necrosis factor
Tris	tris(hexomethyl)aminomethan
TSC1/2	z angl. Tuberous sclerosis complex 1/2
TTBS	z angl. Tris buffered saline with Tween
YAP	z angl. Yes associated protein

1. Úvod

Onkologická onemocnění jsou podle statistik druhou nejčastější příčinou smrti ve vyspělých zemí hned za kardiovaskulárními onemocněními. Statistické záznamy za období 1959-2010 registrují celkem 45 458 pacientů v České Republice trpících leukemií, z toho 55,8 % byli muži a 44,2 % ženy [1].

V současné době je zaznamenaných nad 100 forem rakoviny, které mohou napadat téměř všechny tkáně a orgánové soustavy v lidském organismu. Onemocnění je doprovázeno abnormálním růstem buněk, které mají potenciál napadat okolní zdravé tkáně anebo se mohou šířit do jiných částí těla, tzv. metastázovat. Mezi nejznámější a nejčastěji se vyskytující formy rakoviny patří rakovina tlustého střeva, rakovina plic, rakovina prsa, rakovina prostaty či leukemie [2, 3].

Leukemie je onemocnění postihující především krev, kostní dřeň a lymfatický systém pacienta. Toto onemocnění je doprovázeno genetickými a epigenetickými změnami s následnou transformací zdravé krevní buňky na leukemickou. Podle původu buněk, které podlehnou maligní transformaci, dělíme leukemii na dva hlavní typy, a to leukemii lymfoidní a myeloidní. První typ leukemie, lymfoidní, postihuje T- a B-lymfocyty, plazmocyty a NK buňky (z angl. natural killer cell). Druhý typ leukemie, myeloidní, postihuje granulocyty, monocyty, trombocyty a erytrocyty. Podle klinického průběhu onemocnění můžeme leukemii rozdělit na leukemii chronickou a akutní. Vzniklé dceřiné leukemické buňky jsou nevyzrálé a přispívají k potlačení zdravé krvetvorby v krvetvorných orgánech, jež představuje například kostní dřeň. Abnormální buňky se tu kumulují a následně migrují do krevního oběhu. Konkrétní příčina vzniku onemocnění není doposud objasněna, nicméně z dosavadních studií se podařilo prokázat mnoho faktorů fyzikálních, chemických a biologických, které vzájemným působením na organismus podmiňují rozvoj tohoto onemocnění [4, 5].

Onemocnění postihuje pacienty bez ohledu na pohlavní a věk, přesto však podle určitých statistik lze usoudit, že častěji postihuje mužské pohlaví než ženské, a také se vyskytuje více u europoidní rasy. Celosvětově odhadovaný počet úmrtí v důsledku leukemie představuje za rok 2017 přibližně 24 500 pacientů, tento počet tvoří 4,1 % ze všech úmrtí způsobených rakovinovým onemocněním [6].

Výzkumy a klinické studie udělaly v této oblasti od minulého století obrovský pokrok od klinické podstaty přes cytomorfologickou, histochemickou, imunologickou až na úroveň

molekulární genetiky s možností sledování mutagenních aberací a abnormalit, které ovlivňují diferenciaci, proliferaci nebo apoptosu rakovinových buněk. Srovnatelně výrazný posun nastal i v oblasti diagnostiky a léčebných metod. Dnes se díky těmto pokrokům podaří leukemii vyléčit u poměrně vysokého procenta pacientů, ve sledovaném období 2007-2013 bylo celosvětově vyléčeno až 60,6 % pacientů trpících leukemií [6]. Výzvou však nadále zůstává hledat nové inovativní postupy, které zkvalitní proces léčby, sníží toxický vliv léků na organismus a v ideálním případě udrží kompletní remisi onemocnění bez její recidivy.

2. Kancerogenese a metabolismus nádorových buněk

Nádorové buňky dělíme na dva typy, maligní (zhoubné) a benigní (nezhoubné) nádory. Nejobávanější formou jsou maligní nádory, u kterých dochází k nekontrolovatelnému zhoubnému bujení buněk a nadměrné proliferaci. Právě tyto nádory jsou označovány pojmem rakovina. Charakteristickou vlastností všech typů nádorů je jejich určitá přirozená progrese ve směru od benigního fenotypu, přes maligní až ke konečnému metastatickému fenotypu.

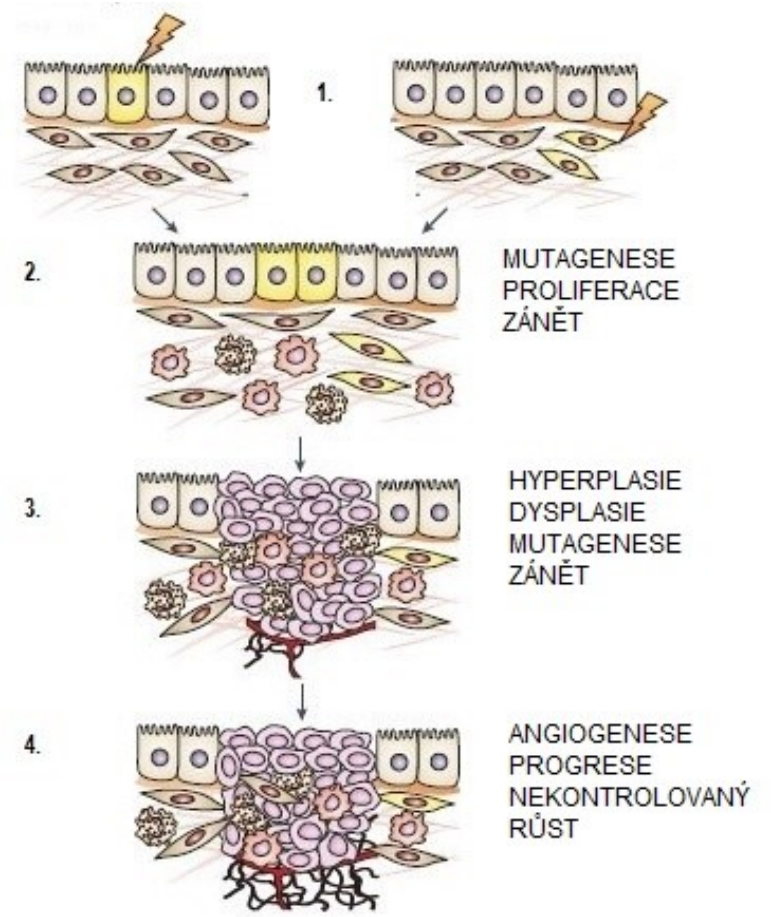
Vznik maligních nádorů je podmíněn mutací genu v somatické, případně zárodečné buňce. Mutace se nejčastěji projeví pouze v jedné buňce a následně se procesem dělení přenese na další buněčné generace. Jedná se o tzv. klonální charakter progrese nádorů, viz Obrázek 1. Při tomto způsobu dochází k postupnému dynamickému vývoji většího množství sublinií nádorových buněk z primárního klonu neoplastických buněk. Sublinie se vzájemně liší stupněm své malignity, sadou různých mutací a taky mají různou schopnost vzájemné komunikace na podněty vnitřního nebo vnějšího prostředí. Tyto podněty způsobují určité formy selekčního tlaku, na který buňky reagují dalšími biologickými změnami. Díky tomu je možné označit tumory za heterogenní populace buněk. Čím více jsou buněčné populace maligní a agresivní, tím vyšší mají tendenci metastázovat a stávají se tak více rezistentní vůči způsobům klinické léčby [7].

Známe více typů rakovinových buněk, které se vzájemně liší zejména po genetické stránce, přesto se všechny tyto buňky charakterizují společnou vlastností, a to pozměněným metabolismem. Buňky potřebují pozměnit svůj metabolismus, aby byly schopné se přizpůsobit zvýšeným potřebám a nárokům nezbytných k proliferaci abuněčnému růstu.

Právě tento specifický znak rakovinových buněk je v posledních desetiletí centrem zájmu a pozornosti pro mnohé vědce, kteří se po celém světě snaží v rámci výzkumů a rakovinových terapií soustředit zejména na metabolismus a buněčnou signalizaci nebo rozpoznat jedinečné a specifické znaky, jež mohou být později použity při konečném ničení buněk bez poškození okolních zdravých buněk organismu.

Existuje mnoho faktorů, které přispívají k transformaci zdravé buňky na rakovinovou. Zásadní jsou vrozené genetické faktory, přítomnost onkogenních virů, životní prostředí a životní styl pacienta. Přestože tyto faktory nejsou na sobě závislé, mohou společně napomoci k onkogenesi zdravých buněk. Takto vzniklé nádorové buňky s pozměněným vlastním metabolismem v dalším kroku přispívají k exprimaci specifických genů a látek, které mohou

indukovat další neurohumoralní, a tedy i metabolické, změny v celém organismu pacienta. Takové změny jsou závislé od typu nádoru, lokace a stádia nemoci [8].



Obrázek 1. Průběh onkogenese.

1. Vlivem určitých vnějších anebo vnitřních faktorů dochází k poškození genetického materiálu v buňce. Toto poškození vede k trvalé stabilní genetické změně neboli mutaci. 2. Mutace se přenáší z generace na generaci. Podněcuje změny v buňkách, které stimulují následnou proliferaci, čímž se buňky stávají autonomními a nereagují na okolní podněty. 3. Důsledkem nadměrné proliferace takových buněk vznikne maligní klon. 4. Nekontrolovatelné bujení a růst maligního klonu vede ke vzniku zhoubného nádoru. Upraveno podle [URL1].

2.1. Metabolismus nádorových buněk

Transformací zdravých buněk dojde ke vzniku nádorových buněk. Nádorové buňky se navzájem liší typem a genetickými vlastnostmi, avšak existují určité vlastnosti, které jsou společné pro všechny nádorové buňky. Mezi tyto společné vlastnosti patří:

- Soběstačnost v produkci růstových hormonů
- Zvýšená proliferace
- Změny v metabolismu
- Nesmrtelnost a aktivace enzymu telomerasa
- Nestabilita genomu
- Poškození kontrolních mechanismů apoptosy
- Posílení angiogenese
- Schopnost metastázovat

Na základě výše uvedených univerzálních poznatků víme, že nádorové buňky mají specifický metabolismus, jehož hlavním cílem je zabezpečit dostatečnou synthesu, a tedy i množství prekurzorů nezbytných pro buněčný růst a proliferaci. Buňky se snaží upravit a přizpůsobit svůj metabolismus ve prospěch zvýšených energetických a nutričních požadavků [9].

Každý typ buňky má jiné metabolické požadavky, které jsou určeny tkáňovou funkcí buňky a prostředím, ve kterém se buňka vyskytuje. Rapidní proliferaci buněk předchází jejich vymanění se ze stavu, kdy je příjem živin nízký a udržují se pouze bazální funkce, a následný postup do stavu, při kterém buňky absorbují živiny ve zvýšené míře, přičemž aktivují anabolické dráhy. které následně umožní rychlý růst a proliferaci [10].

Základními substráty jsou glukosa (GLK) a glutamin, protože disponují dostatečným množstvím uhlíkových koster pro synthesu biomolekul a vazebných elektronů pro bioenergetické procesy. Metabolismus GLK podporuje substrátovou fosforylaci a je tak zdrojem makroergních molekul adenosintrifosfátů (ATP), a to zřejmě i v případě nedostatečné aktivity respiračního řetězce (RR). Glutamin je zdrojem dusíků při synthese purinových a pyrimidinových bází, potřebných při synthese nukleových kyselin [11].

Otto Warburg poprvé zaznamenal a popsal tyto specifické metabolické změny už v roce 1922. Takto transformované buňky si musí poradit se změnami vnitřního prostředí, zejména s hladinou pH. Buňky mobilizují systémy, které je udržují na fysiologické úrovni a poskytnou jim optimální podmínky pro následné dělení a růst. To, co rakovinovým buňkám dodává jejich sílu je ale možné využít i proti nim. Právě to byl důvod k velkému množství klinických studií v posledních letech, které jsou zaměřeny především na rakovinový metabolismus, signalizaci a jejich následnou blokádu, resp. pozměnění, protože takový způsob léčby by ovlivňoval okolní zdravé buňky ve výrazně menší míře, oproti dosavadním, více toxickým terapiím [8].

2.2. Metabolismus sacharidů v nádorových buňkách

Příjem GLK a glutaminu v nádorových buňkách je mnohonásobně vyšší ve srovnání se zdravými okolními buňkami. Glykolysa v rakovinových buňkách je schopná produkovat až 60 % celkového ATP, čímž pokrývá energetické nároky buňky. Taková glykolysa je oddělená od respirace, a tak je oproti glykolyse ve zdravých buňkách 100krát rychlejší. Z toho potom vyplývá, že má-li rakovinová buňka dostatečný přísun GLK, je schopná vyprodukovat za stejnou dobu vyšší množství molekul ATP ve srovnání s buňkami, jejichž glykolytický tok směřuje až k terminální oxidaci a oxidační fosforylaci [11].

Zvýšená míra vychytávání GLK z extracelulárních tkání rakovinovými buňkami je způsobena zejména nadměrnou expresí genů pro enzym hexokinasu, glukosové transportéry GLUT1, GLUT3 a další transportéry, které nejsou přítomny při fysiologických podmínkách u většiny tkání organismu [8].

Rychle proliferující buňky musí zabezpečit dostatečný přísun uhlíkových prekurzorů potřebných k replikaci genomu, tvorbě buněčných membrán a translaci proteinů.

GLK je základní a nejrychleji využitelný zdroj energie v lidském organismu. Buňky využívají glukosu jako hlavní substrát v mnoha metabolických dráhách, například glykolyse, pentosové dráze (PD) nebo hexosaminové biosynthese, a jsou schopné upravit její tok podle svých potřeb. Tyto dráhy dále poskytují prekurzory pro další makromolekuly pocházející z cyklu trikarboxylových kyselin, které se podílejí na stavbě buněk a mitochondriální respiraci, kde dochází ke vzniku energie ve formě molekul ATP.

Naše současné porozumění metabolickým drahám je z velké části založeno na studiích neproliferujících buněk v diferencovaných tkáních. Neproliferující zdravé buňky primárně

metabolizují GLK na oxid uhličitý a vodu v Krebsově neboli citrátovém cyklu (KC), který produkuje redukované formy koenzymů nikotinamidadenindinukleotidu ($NADH+H^+$) a taky flavinadenindinukleotidu ($FADH_2$). Tyto koenzymy se reoxidují a předávají elektrony oxidační fosforylaci v mitochondriálním RR, přičemž dochází k maximální produkci molekul ATP a minimální produkci laktátu.

Bylo zjištěno, že rakovinové buňky preferují aerobní glykolysu, při které tok metabolitů nepokračuje až do oxidační fosforylace, a to bez jakéhokoliv mitochondriálního defektu. Proto se hledala jiná alternativní vysvětlení tohoto přeprogramování metabolismu v rakovinových buňkách [12]. Ačkoliv se na první pohled může tato metabolická změna zdát neefektivní a málo výhodná kvůli malému množství nabízených molekul ATP v celkové energetické bilanci v porovnání s klasickou aerobní glykolysou, její výhoda spočívá v tom, že buňka může odevzdat meziprodukty glykolysy biosynthetickým anabolickým drahám, čímž napomůže k výstavbě nových dceřiných buněk a podpoří tak proces buněčné proliferace [13].

Pyruvát, koncový produkt glykolytické dráhy, představuje hlavní substrát pro mitochondriální metabolismus. Důležité je, že metabolické cesty odvozené od glykolysy poskytují také meziprodukty pro synthesu aminocukrů, AK a nukleotidů.

Prekurzor potřebný k synthese nukleotidů je 5-ti uhlíkatý sacharid, ribosa-5-fosfát (R5P). R5P vzniká v průběhu PD, která je přímo napojená na glykolytickou dráhu a je taky hlavním producentem redukovaných forem nikotinamidadeindinukleotidfosfátu ($NADPH+H^+$) v buňkách. Tato redukovaná forma koenzymu je potřebná při synthese mastných kyselin (MK), stejně jako i v ochranných procesech buňky před volnými radikály.

Nedávná zjištění poukazují na sníženou hladinu enzymu pyruvátkinasy M1 (PKM1) v rakovinových buňkách v důsledku preferenční exprese isoformy PKM2 podporovanou onkoproteinem C-MYC a současnou inhibicí enzymu pyruvátdehydrogenasy (PDH). Je-li glykolytický tok velmi rychlý a hladina prekurzoru glukosa-6-fosfát (G6P) velmi nízká, pak začnou rakovinové buňky exprimovat enzym PKM2, jenž zpomaluje poslední krok glykolysy. PKM2 je isoforma PKM s mnohem nižší katalytickou rychlostí přeměny fosfoenolpyruvátu na pyruvát a je velmi senzitivní na přítomnost volných radikálů v buňce, které snižují její aktivitu. Právě toto zpomalení posledního kroku glykolytické dráhy má za následek odklonění G6P do PD [16-18].

Glykolytická dráha je v buňkách limitována dostupností koenzymu NAD^+. V průběhu glykolysy vzniká jeho redukovaná forma $NADH+H^+$, která nemá možnost se v rakovinových buňkách efektivně a rychle reoxidovat, protože respirační řetězec je pozastavený. Tento problém řeší rakovinové buňky zvýšením exprimace enzymu laktátdehydrogenasy (LDH),

který konvertuje cytosolický pyruvát na laktát a zároveň reoxiduje redukovaný $NADH+H^+$ zpět na oxidovanou formu. Během této reakce dochází k nadměrné produkci laktátu, který buňkám poskytuje jisté selekční výhody. Buňky laktát uvolňují do extracelulárního prostoru, mění se pH, a tak chrání nádorové buňky před imunitním systémem organismu, protože zabezpečuje inhibici cytotoxických T-lymfocytů. Zároveň má vliv i na buněčnou adhezi, jíž oslabuje a přispívá tak ke zvýšené schopnosti buněk metastázovat do okolního prostoru. V neposlední řadě, snížení okolního pH je signálem pro zvýšení vaskularizaci nádoru, což může taktéž napomoci ke zvýšení schopnosti metastázovat [8].

2.3. Metabolismus glutaminu v nádorových buňkách

Glutamin, neesenciální aminokyselina, je přijímán nádorovými buňkami ve zvýšeném rozsahu, protože je nezbytný zejména jako prekurzor při synthese aminokyselin, nukleotidů, hexosaminu. Jeho úloha spočívá i v modulaci signálních drah podílejících se na procesu buněčné proliferace a růstu.

Glutamin je po svém vstupu do mitochondrií přeměněn na glutamát podléhající transaminaci, při které z něj vzniká α-ketoglutarát. Ten je schopný částečně zásobovat KC v nádorových buňkách. KC je nezbytný zejména kvůli tvorbě redukovaných forem koenzymů $NADH+H^+$ a $FADH_2$, a tím se podílí na udržování mitochondriálního membránového potenciálu v buňkách. Hlavní glutaminový prekurzor α-ketoglutarát může také v buňkách podléhat karboxylaci za vzniku isocitrátu a následně citrátu, který může být konvertován na cytosolický acetylkoenzymA (acetylCoA). Cytosolický acetylCoA je pak hlavním substrátem při synthese MK a tedy i následné lipogenesi. Navíc z něj katalytickým působením může vzniknout malát a následně pyruvát, který opětovně dokáže poskytnout další molekuly acetylCoA, respektive je přeměněn až na oxaloacetát v průběhu KC [8,11,14].

2.4. Metabolismus aminokyselin a proteinů v nádorových buňkách

Nádorové buňky mají vyšší energetické a nutriční požadavky pro svoji existenci oproti zdravým buňkám. Jejich potřeba proliferace, růstu a metastáze je nutí zvýšit energetický příjem. Podobně jako je to s nadměrným transportem GLK, je to i s AK. Nádorové buňky transportují zvýšené množství AK, které dále využívají ať už v procesu proteosynthesy nebo

jako zdroj energie a dusíku. Studie poukazují zejména na nadměrnou utilizaci metioninu, argininu, tryptofanu, glutaminu, asparaginu a serinu [8, 43].

2.5. Metabolismus lipidů v nádorových buňkách

Lipidy patří mezi základní složky potravy, které mají významný vliv na fysiologii organismu. Podílí se především na regulačních a metabolických aktivitách, plní stavební funkci a jsou nenahraditelným zdrojem energie.

Lipidy ovšem bývají taky často označovány jako jeden z rizikových faktorů. Důvodem není ani tak jejich kvantita, jako především jejich složení a poměr nenasycených a nasycených MK v jejich molekule. Nenasycené MK s vysokým podílem dvojných vazeb jsou nenahraditelnými složkami fosfolipidových membrán, ovlivňujících jejich biochemické a biofyzikální vlastnosti, s dopadem zejména na proteiny, přenášeče a receptory, jež jsou v kooperaci s membránou. Mají významnou úlohu i při synthese eikosanoidů, metabolitů ovlivňující regulační funkce organismu, a jiných specifických metabolitů modelujících signální dráhy, expresi genů nebo mající roli intra/intercelulárních mediátorů v organismu.

Nádorové buňky jsou známé svým lipogenním charakterem. Dochází v nich ke zvýšené biosynthese MK a zároveň vykazují nižší citlivost k nutričním přístupům. Transkripční faktor SREBP1c (z angl. Sterol regulatory element-binding protein) se podílí na regulaci synthesy MK. Jeho aktivita bývá často regulována buď nutričně, humorálně anebo přes signální dráhy PI3K/AKT a ERK1/2 [8,15].

3. Signální dráhy v nádorových buňkách

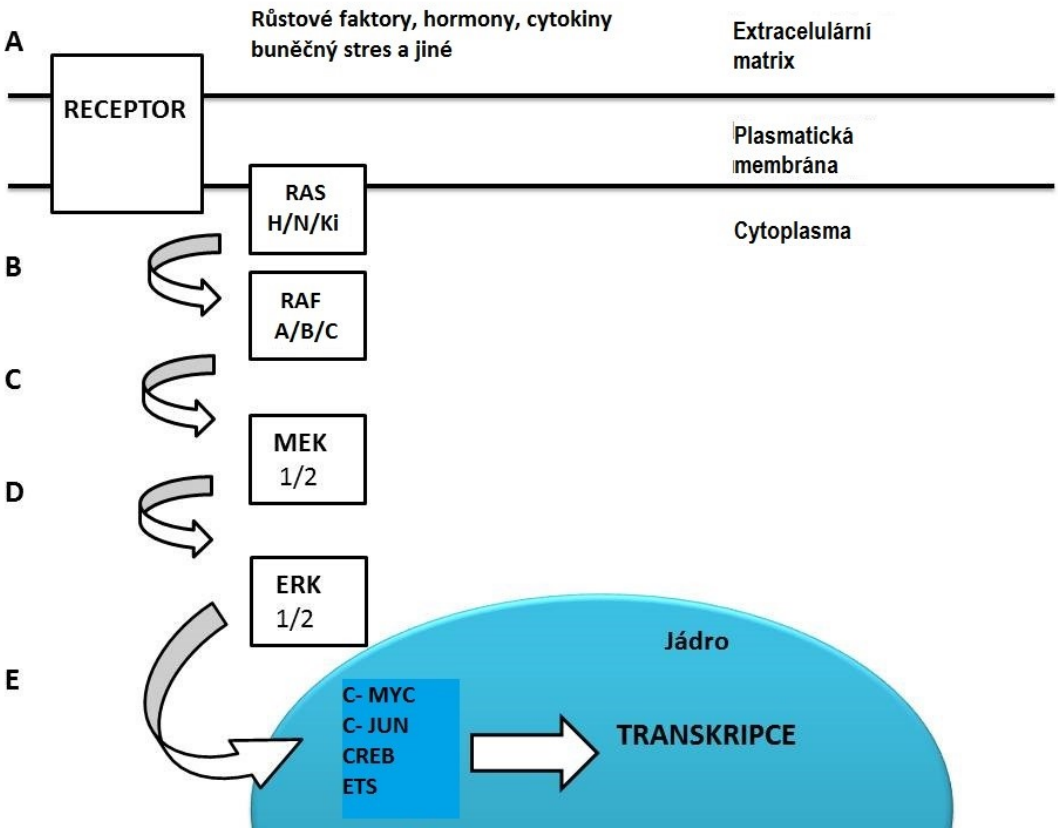
Buňky mají schopnost vzájemné komunikace. Je to jedna z jejich základních a esenciálních vlastností, díky které mohou reagovat na podněty z extracelulárního prostředí. Buňka zachytí signál z vnějšího prostředí a přenese ho prostřednictvím signální kaskády až do efektorového místa v intracelulárním prostoru. Po zpracování signálu se efekt projeví na úrovni metabolismu, buněčné morfologii nebo genové expresi, což dále ovlivní osud buňky.

Nádorové onemocnění je velmi často charakterizováno deregulací signálních drah. Poruchy signálních kaskád, např. inhibice určitého mezičlánku nebo mutace genu, který ho kóduje, poskytují buňkám proliferační výhody a brání jejich apoptose [19,20]. Onkogenní aktivace signálních transdukčních drah způsobuje zejména zvýšené vychytávání živin buňkami a přispívá tak ke kontinuální biosynthese makromolekul a proliferaci buněk [43].

3.1. RAS/RAF/MEK/ERK signální dráha

RAS/RAF/MEK/ERK signální dráha je zodpovědná za propojení signálů, které jsou přijímány receptory nacházejících se na povrchu buňky, s transkripčními faktory v jádru, jež v konečném důsledku regulují genovou expresi. Receptory na povrchu buňky přijímají signál, nejčastěji chemické povahy (hormony, cytokiny, růstové faktory atd.), následně buňky tento signál zpracují, a tím dojde k aktivaci kaskády.

RAS/RAF/MEK/ERK má v konečném důsledku různé efekty na buňky, protože ERK fosforyluje velké množství molekul, které jsou přítomny jak při regulaci progresu buněčného cyklu, tak i apoptose, buněčné diferenciaci nebo buněčné proliferaci [21]. Diagramový přehled této kaskády je zobrazen na Obrázku 2.



Obrázek 2. Zjednodušené schéma RAS/RAF/MEK/ERK signální kaskády

A. Na buňku působí určitý stimul, např. buněčný stres, nebo na receptor v cytoplasmatické membráně nasedá růstový faktor, cytokin, hormon nebo jiný mitogen. V důsledku toho dojde k vyvolání aktivace G-proteinu RAS (Ha, N, Ki) a signální kaskády. B. RAS váže protein RAF (A, B, C), který je aktivován řadou komplexních reakcí. C. RAF jako serin/threoninová kinasa fosforyluje MEK (1/2)**. D.** MEK jako duální tyrosin a serin/threoninová kinasa fosforyluje ERK (1/2)**.** E. ERK se translokuje do jádra a jako serin/threoninová kinasa fosforyluje řadu transkripčních faktorů, které potom ovlivňují proces transkripce.

3.1.1. Průběh a komponenty RAS/RAF/MEK/ERK signální kaskády

Hlavní aktivátor dráhy je RAS (z angl. Rat *s*arcoma), protein s nízkou molekulovou hmotností, který je členem rodiny G-proteinů vykazujících GTPasovou aktivitu. Stejně jako většina G-proteinů i RAS plní regulační funkci a podílí se na přenosu signálu zachyceného buněčnými receptory až ke konečnému buněčnému efektoru. Jeho velmi důležitá úloha je

při procesu buněčné signalizace, kde plní funkci aktivátoru RAF/MEK/ERK kaskády a je také molekula účastnící se několika jiných drah, jako například PI3K/AKT nebo RalEGF/Ral [22].

RAS je umístěný na vnitřní straně cytoplasmatické membrány buňky, kde je ukotven prostřednictvím kovalentně vázaných lipidových kotev. Nejčastěji se vyskytující posttranslační modifikací, pomocí které se váže na membránu, je farnesylace, ta je katalyzována enzymem farnesyltransferasa. Méně častá modifikace je geranylgeranylace, jíž katalyzuje enzym geranylgeranyltransferasa. Obě tyto posttranslační modifikace se objevují v RAS na stejném cysteinovém zbytku a jsou velmi důležité, protože představují teoreticky vhodné terapeutické cíle pro klinickou léčbu [23].

Rozlišujeme celkem 4 isoformy RAS proteinu: Ha- RAS
N- RAS
Ki- RAS 4A
Ki- RAS 4B

Isoformy byly pojmenovány podle svých objevitelích Jeniferovi Harveym (Ha- RAS) a Werneru Kirstenovi (Ki- RAS), kteří je identifikovali v myším sarkomu. Další studie vedly k objevení isoformy v buňkách neuroblastomu, známé jako N-RAS [24]. Každá tato isoforma vykazuje rozdílné schopnosti aktivace signální kaskády RAF/MEK/ERK a PI3K/AKT. Například protein Ki- RAS je silnějším induktorem kaskády RAF/MEK/EPK oproti Ha- RAS isoformě, ale v případě PI3K/AKT kaskády je naopak nejsilnějším induktorem Ha- RAS ve srovnání se zbylými isoformami [23]. Po vazbě cytokinů, růstových faktorů, hormonů anebo jiných mitogenů na příslušné receptory dochází v buňce k aktivaci komplexu SHC/GRB2/SOS. Kombinace extracelulárních stimulů a aktivního komplexu SHC/GRB2/SOS podnítí přeměnu neaktivního RAS na aktivní, molekula guanosindifosfátu GDP vázaná neaktivní formou se vymění za guanosintrifosfat GTP, čímž dojde ke konformační změně enzymu. Takto aktivovaný RAS spouští následnou signální kaskádu [25].

Další člen signální kaskády v buňkách je RAF, serin/ threoninova (S/T) kinasa. Celkem jsou známy 3 isoformy tohoto enzymu: RAF A, RAF B a RAF C, které se vzájemně liší svými fosforylačními místy a aktivačním účinkem [26]. Jednotlivé funkce těchto isoforem RAF nejsou doposud zcela objasněné. Přestože jsou všechny tři proteiny RAF aktivovány onkogenním RAS, používají stejný adaptorový protein pro konformační stabilizaci a jsou zaměřené na stejné molekuly MEK1 a MEK2, mají odlišné biologické a biochemické vlastnosti [25].

Protein RAF je aktivován komplexní sérií událostí zahrnující:

1. Translokaci proteinu RAF na plazmatickou membránu zprostředkovanou interakcí s aktivovaným proteinem RAS [23]
2. Dimerizaci RAF proteinů [27]
3. Fosforylaci/defosforylaci různých regulačních domén RAF proteinu [28]
4. Disociaci od RKIP (z angl. Raf kinase inhibitory protein) [29]

Dimerizace je velmi důležitý proces v průběhu aktivace RAF proteinu. V některých případech může RAF B tvořit heterodimer s RAF C, což má za následek řadu výhod, protože oproti homodimerům RAF B nebo RAF C mají heterodimery odlišnou substrátovou specifitu a afinitu [30,31].

Proces fosforylace a defosforylace isoforem je také velmi důležitý při aktivaci RAF proteinu. RAF C obsahuje minimálně 13 regulačních fosforylačních míst, a právě fosforylace těchto míst má vliv na jeho aktivitu. Jsou-li zbytky serinu (S)- S43, S359, S621 v molekule RAF C fosforylovány, pak je isoforma inaktivní, a to umožňuje její interakci s proteinem 14-3-3, který brání jeho translokaci na cytoplasmatickou membránu. Během buněčné stimulace se S621 dočasně defosforyluje doposud neidentifikovanou fosfatásou. Fosfatasa 2A (PP2A) zase defosforyluje S259 [29]. Defosforylace má za následek uvolnění 14-3-3 proteinu z RAF C. Tato isoforma je postupně fosforylována na serinech a tyrosinech (Y)- S338, Y340 a Y341, čímž se stává aktivní. S338 fosforylace je stimulována prostřednictvím RAS a závisí i na PAK (p21 protein kinase) [32]. Kinasa rodiny SRC pravděpodobně způsobuje fosforylaci tyrosinových zbytků Y340 a Y341, proto vedlejší efekt kinasových inhibitorů rodiny SRC, které se používají při léčbě chronické myeloidní leukémie (CML), například lék Dasatinib, má za následek supresi RAF/MEK/ERK signální dráhy, což přináší jak žádoucí, tak i nežádoucí účinky [33]. Hlavní fosforylační cíle isoforem RAF C (Y340 a Y341) a RAF A (Y299 a Y300) jsou v molekule RAF B nahrazeny jinou aminokyselinou, konkrétně aspartátem (D) (D492 a D493) [28], který vnáší do molekuly RAF B záporně nabité skupiny, napodobující fosforylované aktivované zbytky v RAF C a RAF A. Na rozdíl od ostatních isoforem je aktivace RAF B nezávislá na aktivitě SRC kinás [33].

RAF fosforyluje dalšího člena kaskády, protein MEK (z angl. mitogen activated protein kinase), který je současně duální Y- a S/T kinasa. Vyskytuje se ve dvou isoformách, MEK1 a MEK2. Aktivita těchto isoforem je pozitivně regulována fosforylací S- zbytků v jejich katalytické doméně. Všechny isoformy RAF mohou fosforylovat MEK, přesto však byly

zpozorovány odlišné biochemické aktivační účinky, které rostou ve směru od isoformy B››C››A. Zajímavým aspektem je i to, že hlavním cílem MEK1 je ERK, a tedy terapeutické zaměření konkrétně na MEK1 se jeví jako relativně specifické [34].

ERK (z angl. extracellular signal regulated kinase) má také dvě isoformy, ERK1 a ERK2. Tyto proteiny patří do rodiny S/T kinás. Obě mají mnoho cílů, které fosforylují (více než 160). Přímo fosforylují transkripční faktory, mezi které patří ETS 1, C-JUN a C-MYC. Také mohou fosforylovat ribosomální S6 kinasu (S6K), jež řídí aktivaci transkripčního faktoru CREB. ERK může fosforylovat i mnohé proteiny zapojené do regulace buněčného cyklu. ERK2 je pozitivně spojována s proliferací, zatímco ERK1 v určitých buňkách může inhibovat účinky ERK2 [25].

3.1.2. Vliv dráhy na progresi buněčného růstu, proliferaci, apoptosu a rakovinu

Komponenty RAS/RAF/MEK/ERK kaskády se podílí na regulaci exprese velkého počtu proteinů, které regulují buněčný cyklus, buněčný růst, apoptosu nebo progresi rakoviny. Tyto procesy se vzájemně výrazně liší a jejich mechanismy nebyly doposud zcela objasněny, proto je tato kaskáda předmětem mnohých výzkumů.

Mezi molekuly regulující progresi buněčného cyklu patří P16INK4A, P15INK4A a P21CIP1. Jejich pozměněná exprese vlivem RAS/RAF/MEK/ERK kaskády může vést k předčasnému zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 [35].

Osud buněk a proces, jenž se v konečném důsledku projeví, závisí především na hladině a isoformě exprimovaných kinás. Ektopická nadměrná exprese proteinů RAF bývá spojována zejména s proliferací hematopoetických buněk [74]. V závislosti na konkrétní isoformě RAF může jeho nadměrná exprese vést jak k buněčné proliferaci (vlivem RAF A, RAF C), tak i k zastavení buněčného růstu (vliv RAF B) v NIH-3T3 fibroblastech a hematopoetických buňkách FDC-P1 [35,36]. Dodnes není zcela jasné, proč tato nadměrná exprese genu *RAF* může vést k natolik rozdílným buněčným procesům. Jedno z možných vědeckých vysvětlení cílí právě na rozdílné koncentrace a aktivity konkrétních isoforem RAF onkoproteinů a jejich homo/heterodimér [35].

Při procesu apoptosy se kaskáda podílí na její inaktivaci tím, že ovlivňuje transkripční faktory a klíčové molekuly. Kaskáda fosforyluje protein BAD na S112, tato posttranslační úprava pak napomáhá k inaktivaci a jeho vázání s 14-3-3 proteiny [37]. Vazba s proteiny 14-3-3 má vliv na protein BCL-2, který začne tvořit homodiméry a generuje antiapoptickou

odezvu. Kaskáda zároveň fosforyluje proteiny MCL-1 a BIM, přičemž fosforylace BIM vede k jeho disociaci od BCL-2, BCLXL a MCL-1. BIM je následně ubikvitinylován a směřuje do proteasomu, což umožní BCL-2, BCL-XL a MCL-1 vázat protein BAX, a tím dojde k inhibici apoptické dráhy [25,38].

Nedávná studie objevila propojení RAF/MEK/ERK signalizace s Hippo signální dráhou. MST2 je S/T kinasa mající silný proapoptický efekt, nicméně při interakci s isoformou RAF C je její účinek antiapoptický, protože právě tato interakce brání její dimerizaci, a tedy i aktivaci [39].

Další oblast zájmu představuje vztah RAS/RAF/MEK/ERK kaskády a progrese rakoviny. Doposud se podařilo objevit několik mutací stimulujících buněčnou transformaci a proliferaci. Mutace v genech pro RAS proteiny zhoršují jejich celkovou GTPasovou aktivitu a udržují proteiny v konstitutivně aktivním stavu. V takovém případě dochází k neustálému přenosu signálů, i přesto, že chybí extracelulární stimul. *RAS* onkogeny jsou nejčastěji mutované onkogeny s 33% incidencí ve všech typech lidských nádorů. Mutace v genech pro RAS vedoucí k jeho aktivaci se vyskytují především v kodonech 12, 13 a 61, přičemž prevalence mutací v jednotlivých kodonech genů pro Ki- RAS a N- RAS je odlišná [42].

U 7 % ze všech typů nádorů byla zpozorována mutace isoformy RAF B, vyskytující se především při melanomu [41]. Zvýšená exprese ERK byla nalezena u akutní myeloidní a akutní lymfocytické leukemie. V obou případech byla spojována se špatnou prognózou onemocnění [25,40].

3.2. Hippo signální dráha

Hippo signální dráha (HSD) byla objevena a popsána v modelovém organismu *Drosophila melanogaster* [44]. Homology klíčových složek této signální dráhy byly nalezeny a popsány i pro savce. Signální dráha je tvořena minimálně 35 proteiny, přičemž stále všechny nejsou doposud identifikovány a popsány. Savčí HSD je složena především z centrální kinasové kazety (CKCA) tvořenou S/T kinasou MST1/2 (z angl. Mammalian STE20-like protein kinase 1/2), proteinovou kinasou LATS1/2 (z angl. Large tumor suppressor 1/2) a jejich adaptorovými proteiny SAV1 (z angl. Salvador homologue 1), které plní funkci lešení umožňující interakci mezi MST1/2 a LATS1/2, a proteiny MOB1A/1B (MOB kinase activator 1A/1B), jež stimulují aktivitu LATS1/2 kinas. Vzájemnou aktivitou těchto proteinů dochází k fosforylační kaskádě, kdy MST1/2 kinasy fosforylují LATS1/2. Fosforylované LATS1/2 kinasy jsou aktivovány a dále fosforylují onkoproteiny YAP (z angl. YES associated protein) a TAZ (z angl. Transcriptional coactivator with a PDZ-binding domain) na několika serinových zbytcích.

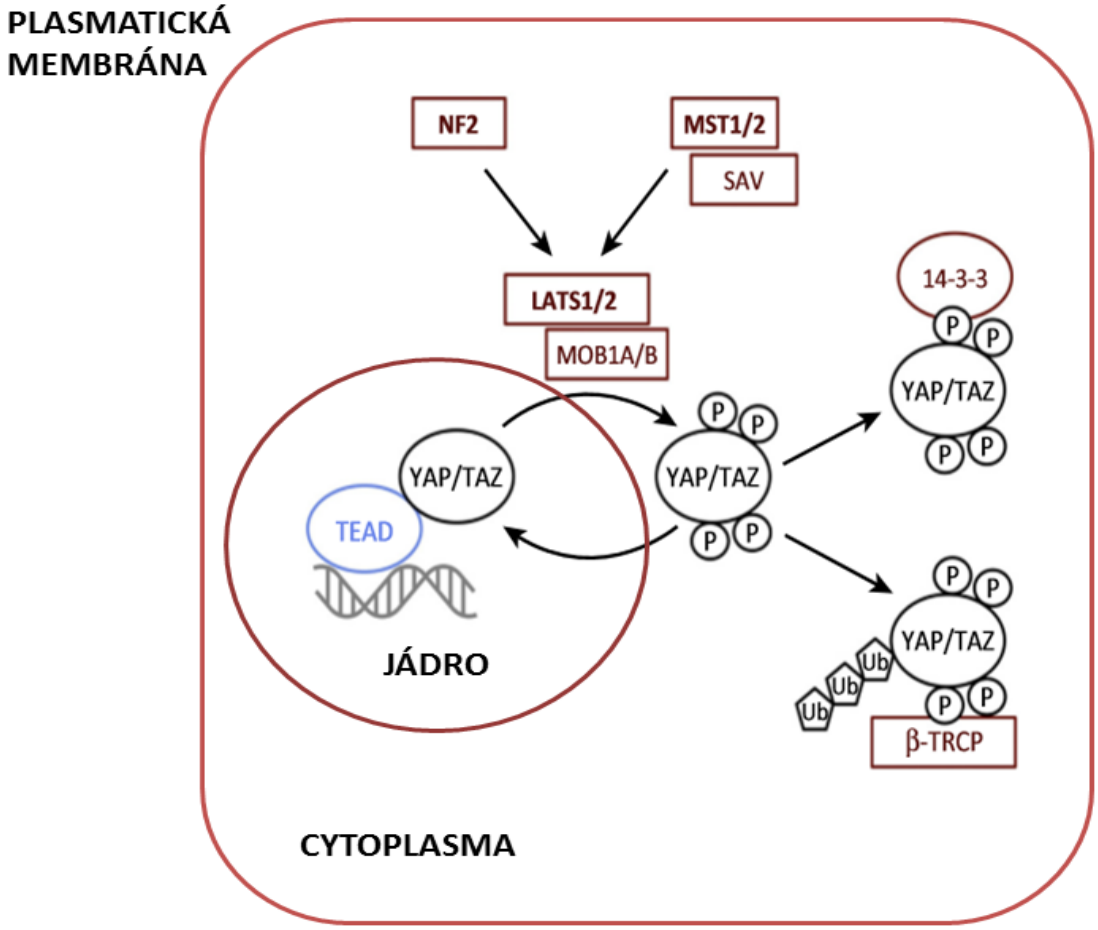
V minulém desetiletí byl zaznamenán vysoký nárůst publikací, které identifikovaly YAP/TAZ jako konečné efektory metabolických a signalizačních drah podporujících růst buněk a jsou považovány za aktivátory buněčné proliferace.

Fosforylace YAP/TAZ vede k funkční inhibici růstu tkáně prostřednictvím několika mechanismů. Mezi tyto mechanismy patří jaderná exkluze, vazba fosforylovaného YAP na protein 14-3-3 a α-catenin, které brání opětovné defosforylaci proteinu a jeho lokalizaci do buněčného jádra, v případě transkripčního koaktivátoru TAZ také ubikvitinylaci a proteosomální degradaci zprostředkovanou ubikvitin ligasou (β – TRCP) [45-48].

Výzkumy poukazují na dvě místa, která podléhají fosforylaci prostřednictvím LATS kinas, S127/381 v YAP a S89/311 v TAZ, a jsou zodpovědná za fosforylací zprostředkovanou inhibici. Fosforylace YAP/TAZ je regulována pomocí fosfatás PP1 rodiny [49,50]. Místo, kde LATS1 fosforyluje YAP/TAZ v buňce není dodnes přesně určeno, avšak obecně se předpokládá, že tento děj probíhá v cytoplasmě [51].

V případě, že je HSD inaktivní nebo deregulována v jednom bodě signalizační kaskády, k fosforylaci onkogenního proteinu YAP a transkripčního ko-aktivátoru TAZ nedochází [52]. YAP/TAZ aktivátory se mohou pohybovat mezi cytoplasmou a jádrem. Nejsou-li fosforylovány, dochází k jejich translokaci do jádra buňky, kde interagují s rodinou transkripčních faktorů TEADs (z angl. TEA domain family member), SMADs a jinými transkripčními faktory [52, 53]. Aktivita těchto proteinů je narušena právě v karcinogenních

buňkách, kde jsou YAP/TAZ hyperaktivní, a tak přispívají k růstu nádorů, nekontrolované proliferaci a získání malignosti včetně autoregulačních a metastatických schopností nádoru [45,53,54]. Obrázek 3 popisuje základní komponenty a mechanismus fosforylační kaskády HSD.



Obrázek 3.Schéma hlavních komponentů a mechanismu působení Hippo signální dráhy. Na obrázku jsou znázorněny hlavní komponenty signální dráhy MST1/2 serin/threoninové kinasy, LATS1/2 proteinové kinasy, proteiny NF2, SAV, MOB1A/B. Je-li signalizační kaskáda aktivní, dochází k fosforylaci YAP/TAZ proteinového komplexu, který zůstává v cytoplasmě a podléhá proteosomální degradaci účinkem ubikvitinligasy β-TRCP nebo je komplex vázaný proteinem 14-3-3. V případě deregulace nebo inaktivity dráhy, YAP/TAZ komplex není fosforylován a dojde k jeho translokaci do buněčného jádra, kde interaguje s transkripčními faktory, například TEAD, a stimuluje tak transkripci a kontinuální buněčnou proliferaci. Upraveno podle [48].

3.2.1. Propojení Hippo signální dráhy s dráhou synthesy mevalonátu a RHO signalizací

První propojení Hippo signalizace a buněčného metabolismu vyplynulo poté, co se podařilo identifikovat dráhu synthesy mevalonátu jako jeden z požadovaných vstupů pro YAP/TAZ aktivitu *in vitro* [55].

Dráha synthesy mevalonátu (DSM) je biochemická dráha, jež katalyzuje postupnou přeměnu acetyl-CoA na biochemické prekurzory isoprenioidů, které postupnou vzájemnou kondenzací a cyklizací produkují cholesterol a prekurzory všech ostatních steroidů v těle, včetně žlučových kyselin, steroidních hormonů, hemu, vitamínu D a jiných [56].

Acetát aktivovaný koenzymem A na acetylCoA je první prekurzor v DSM. Kondenzací dvou molekul acetylCoA katalyzovanou enzymem thiolasa při souběžném uvolňování jedné molekuly koenzymu A dojde k vytvoření acetoacetylCoA. Následnou sekundární kondenzací dvou molekul acetoacetylCoA vznikne meziprodukt 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMGCoA) v reakci katalyzovaný enzymem HMGCoA synthetasa za přítomnosti jedné molekuly vody a uvolnění molekuly koenzymu A. HMGCoA se mění na mevalonát ve dvou po sobě jdoucích redukcích prostřednictvím koenzymů $NADPH+H^+$ katalyzovaných HMGCoA reduktasou (HMGCR). HMGCR je hlavním regulačním místem DSM [56].

HMGCR, nejdůležitější enzym DSM, je v nádorových buňkách často deregulován, a tím je považován za nového člena rodiny metabolických onkogenů [57,58]. Malé molekulové inhibitory, například statiny nebo jiné farmakologické inhibitory a jejich analogy, působí přímo na enzym HMGCR čímž inhibují DSM a zároveň inhibují i aktivitu YAP/TAZ. Statiny indikují apoptickou buněčnou smrt prostřednictvím vnitřní apoptotické dráhy. Takto indukovaná buněčná smrt je podle nejnovějších studií nezávislá na cholesterolu, avšak závislá na vyčerpání isoprenoidních prekurzorů [58].

Mevalonát je prekurzorem isoprenových jednotek. Jeho postupnou fosforylací prostřednictvím 3 molekul ATP a následnou dekarboxylací vzniká aktivní jednotka isoprenu isopentenyldifosfát. Isopentenyldifosfát podléhá izomeraci, přičemž dochází k posunu dvojité vazby v jeho molekule a vzniká dimethylallyldifosfát. Tyto dvě molekuly následně kondenzují za synthesy geranyldifosfátu. Kondenzací geranyldifosfátu s další molekulou isopentenyldifosfátu vznikne farnesyldifosfát (FDP) [56].

Následný vývoj FDP se po své synthese liší. Nejčastěji dochází k jeho kondenzaci na skvalen, z něhož při další katalýze vzniká cholesterol. Nicméně další možností je vznik dolicholu, ubichinonu nebo geranylgeranyldifosfátu (GGDP) za pomoci právě FDP.

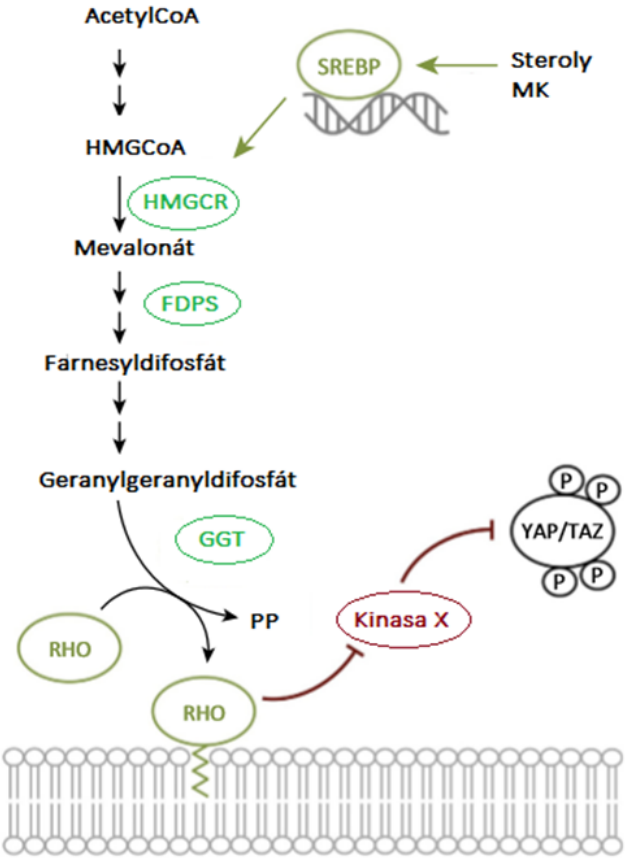
FDP se spolu s GGDP účastní posttranslační modifikace proteinu, tzv. prenylace. Prenylace je kovalentní vazba hydrofobní molekuly isoprenoidu na cysteinové zbytky proteinu, čímž usnadňuje ukotvení proteinu k buněčné fosfolipidové membráně [48]. Právě disekce mezikroků DSM naznačila prenylaci, a především geranylgeranylaci, jako jeden z mechanismů regulující aktivitu proteinového komplexu YAP/TAZ. Tento mechanismus je evolučně konzervován, protože se podařilo prostřednictvím umlčení genu pro enzym geranylgeranyltransferasa (GGT) v tkáni *Drosophily melanogaster* inhibovat protein Yorkie, tedy homolog pro savčí YAP/TAZ aktivátory [55].

Mezi proteiny modifikované prenylací patří RHO GTPasy, které se podle současných studií podílí na udržování aktivity YAP/TAZ. Studie zároveň naznačují, že RHO reguluje YAP/TAZ za pomoci fosforylace neznámé kinasy, nezávislé na LATS1/2 signálních kinásách. Dojde-li k prenylaci proteinu RHO a jejich asociaci s fosfolipidovou membránou, pak svojí GTPasovou činností fosforylují neznámou kinasu, která se stane inaktivní a není schopna fosforylace proteinového komplexu YAP/TAZ [48, 59]. Jednoduchý mechanismus vlivu na HSD prostřednictvím DSM je znázorněn na Obrázku 4.

V karcinogenních buňkách bývá DSM velmi často regulována transkripčním faktorem SREBP (z angl. Sterol regulatory element binding protein), jenž ovlivňuje dostupnost HMGCR [60,61]. Na základě výsledků studií se potvrdilo, že mutantní onkogen *P53* udržuje kontinuální expresi transkripčního faktoru SREBP v maligních buňkách rakoviny prsu [62]. Tento výsledek může představovat možný mechanismus, při kterém mutantní *P53* ovlivňuje aktivitu komplexu YAP/TAZ a přispívá tak k malignitě i jiných typů karcinogenních buněk. Farmakologická léčba rakoviny zaměřená na inhibici aktivity komplexu YAP/TAZ za pomoci inhibice a ovlivňování mevalonátové kaskády by mohla představovat významný pokrok v léčbě.

Inhibicí aktivity HMGCR prostřednictvím statinových léčiv by došlo k modulaci několika signalizačních drah důležitých pro tvorbu a růst nádorů včetně angiogenese, buněčné proliferace, regulace buněčného cyklu, genové exprese, metastatického potenciálu a smrti buněk [63, 64]. Tím, že statiny snižují dostupnost mevalonátu, snižují hladiny GGDP, FDP a cholesterolu a zároveň způsobují zastavení buněčného cyklu a indukci apoptosy [65]. Tento způsob, kdy dojde k inhibici prenylace RHO GTPas pomocí statinu, má za následek, že nedojde k ukotvení těchto RHO GTPas v membráně, ale naopak, zůstanou přítomny v cytosolu buněk, a proto nedojde ani k fosforylaci kinas za pomoci RHO. Kinasy tak zůstávají aktivní a mohou např. fosforylovat proteinový komplex YAP/TAZ, čímž dojde k jeho inaktivaci. Inhibice HMGCR má zároveň vliv i na depleci cholesterolu. To všechno jsou

důležité faktory, které přispívají k následné apoptose nádorových buněk. Přesný mechanismus statinem indukované apoptosy není doposud zcela objasněn [48].



Obrázek 4. Jednoduché propojení dráhy synthesy mevalonátu a aktivity komplexu YAP/TAZ.

Finálním produktem je geranylgeranyldifosfát (GGF), který se podílí na prenylaci proteinů spolu se svým prekurzorem farnesyldifosfátem. AcetylCoA postupně kondenzuje na hydroxymethylglutaryl koenzym A (HMGCoA), ten umožňuje katalytickým účinkem enzymu HMGCoA reduktasa (HMGCR) vznik mevalonátu. Následuje sled reakcí s výsledným produktem farnesyldifosfát, na jehož synthese se katalyticky podílí enzym farnesyldifosfát synthasa (FDPS). Farnesyldifosfát je prekurzorem pro geranylgeranyldifosfát, který účinkem enzymu geranylgeranyltransferasa (GGT) modifikuje protein RHO za stálého uvolňování pyrofosfátu (PP). Prenylace proteinu RHO zabezpečuje asociaci proteinu s fosfolipidovou buněčnou membránou a inaktivuje tak neznámou kinasu X, jež se podílí na fosforylaci komplexu YAP/TAZ. Intracelulární nebo extracelulární dostupnost sterolů a mastných kyselin reguluje aktivaci SREBP transkripčních faktorů regulujících aktivitu HMGCR.
Upraveno dle [48].

3.2.2. Propojení Hippo signální dráhy a metabolismu glukosy

Metabolismus neboli látková přeměna patří mezi základní funkce buňky, které mohou být regulovány prostřednictvím signálních drah a onkogenů. Nově vznikajícím paradigmatem je, že signální a transkripční dráhy mohou být regulovány metabolismem, což umožňuje buňkám koordinovat a řídit jejich metabolismus v průběhu času [48].

HSD v průběhu vývoje organismu reguluje velikost orgánů a v dospělosti je silným tumorovým supresorem. Všeobecný molekulární mechanismu pro tumor supresorovou a antiapoptotickou aktivitu HSD je stále neobjasněn. Nicméně bylo prokázáno, že existuje propojení mezi signalizací a metabolismem sacharidů, především metabolismem glukosy, a proto je možné předpokládat, že by regulace metabolismu GLK mohla sloužit v budoucnosti jako nový tumor supresorový mechanismus řízení HSD a mohla tak být nadějnou cestou k efektivní léčbě rakoviny [45, 47].

Regulace metabolismu GLK a jeho propojení s dalšími metabolickými a signálními dráhami je stále předmětem intenzivního zkoumání. Detailnější porozumění mechanismu spolupráce mezi signálními dráhami a buněčným metabolismem může přinést nové pohledy na různá onemocnění a být velkým přínosem v klinické léčbě.

GLK má schopnost ovlivnit transkripci dvěma mechanismy. První mechanismus objevený u *Drosophila melanogaster* spočívá v intracelulární formě GLK, G6P, která může přímo regulovat její transkripční faktory Mondo A/ChREBP (z angl. Carbohydrat response element binding protein) působící v jádru se svým partnerem Mlx (z angl. Max-like protein x). Tyto transkripční faktory primárně kontrolují expresi enzymů podílejících se na glykolyse a lipogenesi, jež je zprostředkována metabolickou adaptací na měnící se hladinu GLK v buňkách [66]. Metabolismus GLK může také přispívat k celkové hladině ATP, a tak regulovat aktivitu AMPK (z angl. AMP activated protein kinase). Projdou-li buňky stavem energetického stresu, stav, kdy mají nízkou hladinu ATP, pak AMPK fosforyluje protein TSC2 (z angl. Tuberous sclerosis complex 2) a podporuje inhibiční aktivitu TSC1/TSC2 na komplex mTOR (z angl. Mammalian target of rapamycin). Tímto mechanismem AMPK podporuje aktivaci alternativní katabolické dráhy pro obnovení hladiny ATP, čímž se udržuje energetická homeostáze [67,68].

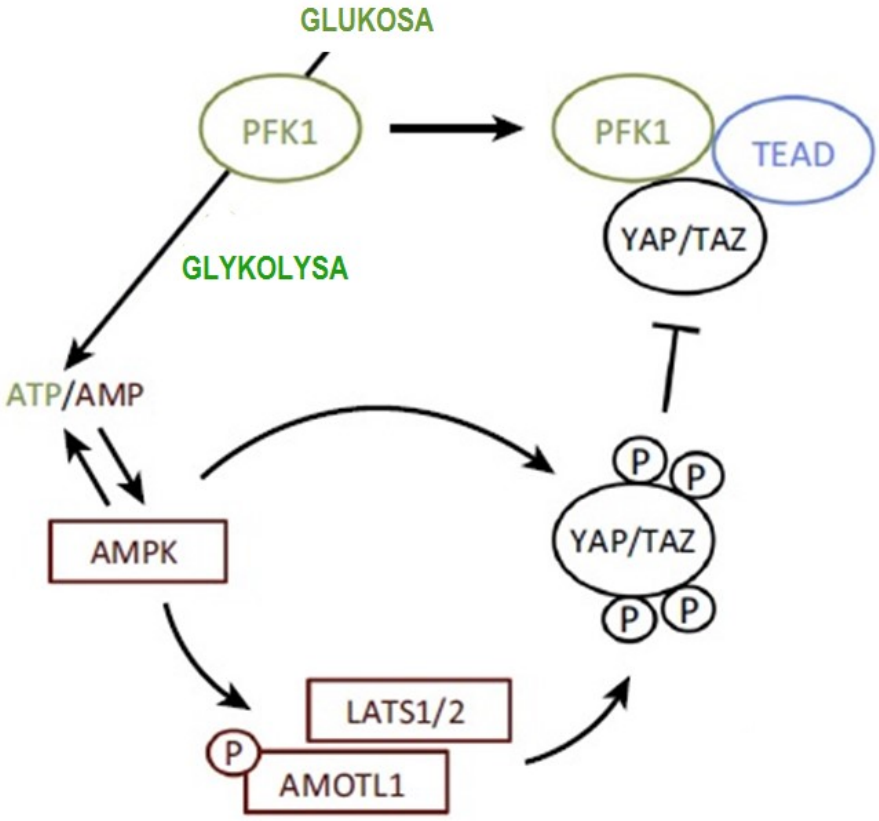
Vztah mezi GLK a aktivitou komplexu YAP/TAZ byl zjištěn nedávnými studiemi. Inhibice příjmu GLK, a tedy nižší aktivita glykolysy, resp. změna průběhu toku metabolitů z aerobní glykolysy až po oxidační fosforylaci, indukovala inhibici aktivity YAP/TAZ v lidských buňkách *in vitro*. Tento mechanismu se zdá být evolučně zachovalý, protože

snížený příjem GLK indukoval inhibici glykolysy i u *Drosophila melanogaster*. GLK reguluje stabilitu transkripčního komplexu s faktory TEAD, a proto je transkripční aktivita YAP/TAZ potom obsažena i v buněčné odezvě na koncentraci GLK [69].

Díky studiím zaměřených na buňky rakoviny prsu se podařilo prokázat vztah mezi aktivitou YAP/TAZ a metabolismem GLK. Právě tyto rakovinové buňky využívají glykolysu i v procesu regenerace [70]. Pozoruhodné je, že aerobní glykolysa je dostačující, při nejmenším *in vitro*, k indukci maligních fenotypů rakovinových buněk paralelně s YAP/TAZ aktivitou, která je u nádorů zvýšena a je funkčně potřebná k regeneraci a agresivitě [71]. Propojení YAP/TAZ aktivity a glykolytické dráhy lze vidět na Obrázku 5.

Zajímavost představuje vysoká exprese genu pro fosfofruktokinasu 1 (PFK1), klíčového enzymu glykolysy a požadovaného partnera YAP, která koreluje i se špatnou prognózou u primární rakoviny prsu [69, 72]. Navíc malé molekulové inhibitory PFKFB3, alosterického regulátoru PFK1, vykazují pozoruhodný inhibiční účinek na růst buněk rakoviny prsu při pokusech [73]. Další zajímavé propojení mezi YAP/TAZ signalizací a glykolysou představuje regulace stability proteinu YAP prostřednictvím O-glykosylace [100]. Tato zjištění naznačují, že aktivita YAP/TAZ u buněk rakoviny prsu je obzvláště citlivá na terapeutické přístupy zaměřené na glykolysu. Budou-li tyto poznatky aplikovány i na jiné typy rakoviny, je možné, že přinesou značný benefit pro celkovou terapii.

Souhrnná zjištění naznačují, že onkogenní aktivita YAP/TAZ musí být koordinována prostřednictvím buněčného metabolismu, aby mohlo dojít k následnému účinnému řízení buněčného růstu. YAP/TAZ představují silné induktory proliferace. Ovšem tato aktivita může být zahájena pouze tehdy, mají-li buňky správné metabolické podmínky podporující jejich buněčný růst. Tento fakt by pravděpodobně přidal rakovinovým buňkám, které podstupují metabolické přeprogramování, například jako odpověď na aktivaci onkogenů nebo na hypoxii, další selektivní výhodu v jejich potenciálu proliferace, přežití a schopnosti metastázovat.



Obrázek 5. Propojení glykolysy a YAP/TAZ aktivity

Glukosa vstupuje do glykolysy, kde dochází k její oxidaci a generování ATP. Regulační enzym glykolysy fosfofruktokinasa 1 (PFK1) přímo ovlivňuje aktivitu YAP/TAZ komplexu tím, že podporuje jeho spolupráci s transkripčním faktorem TEAD v jádru buňky. Nachází-li se buňka v energetickém stresu, kdy je její poměr ATP/AMP nízký, dochází k aktivaci AMP aktivované proteinkinasy (AMPK), která přímo fosforyluje YAP/TAZ komplex a zároveň ho inhibuje, a tak brání jeho translokaci do jádra a vytvoření komplexu s transkripčními faktory TEAD. AMPK zároveň podporuje aktivitu LATS1/2 kinas, fosforylací proteinu AMOTL1, které fosforylují komplex YAP/TAZ. Upraveno podle [48].

3.2.3. Regulace AMPK a vliv na Hippo signální dráhu

Protein AMPK je považován za klíčový energetický senzor podílející se na energetické homeostáze organismu. Výsledky studií zabývajících se tímto enzymem ve vztahu s aktivitou YAP/TAZ prokazují, že představuje jeho negativní regulátor. Inhibiční mechanismus působení AMPK na komplex YAP/TAZ není zcela jednoznačný, a tak se setkáváme s více možnostmi:

1. studie naznačuje možnou fosforylaci proteinu AMOTL1 přímo prostřednictvím AMPK. Fosforylovaný AMOTL1 zvyšuje aktivitu působení Hippo kinas LATS1/2, jež fosforylují komplex YAP/TAZ a tím ho inhibují [74].
2. studie naznačuje, že se AMPK váže přímo na protein YAP a primárně ho fosforyluje na S61, S94 a T119, avšak zároveň může dojít ke zvýšení aktivity LATS1/2 kinas [75].
3. studie zjistila také přímou vazbu AMPK na YAP, ale v tomto případě je primární fosforylační místo S94 proteinu YAP [76].

Právě toto poslední zjištění je pozoruhodné, protože S94 je rozhodujícím místem pro interakci YAP s TEAD. Tento fakt by přímo vysvětloval, proč AMPK inhibuje tvorbu komplexu YAP-TEAD. Souhrnně je možné na základě dosavadních biochemických a molekulárních pozorování a studií tvrdit, že aktivace AMPK může indukovat jak přímou, tak LATS1/2 závislou YAP fosforylaci, a tedy i inhibici.

V budoucnu bude důležité pochopit podmínky, při kterých může být přímá aktivace AMPK nástrojem k inhibici aktivity YAP/TAZ. Výsledky pro přímou inhibici YAP/TAZ pomocí AMPK jsou doposud nekonzistentní a odvíjí se od buněčné linie i navzdory účinné modulaci AMPK [50]. Kromě toho, záchrana aktivity YAP/TAZ farmakologickou blokádou nebo vyřazením AMPK z buněk zbavených GLK byla buď částečná, nebo neúčinná [69,75]. Právě proto je možné, že regulace YAP/TAZ glukosou zahrnuje více paralelních mechanismů závislých i nezávislých na AMPK.

3.3. PI3K/ AKT/ mTOR signální dráha

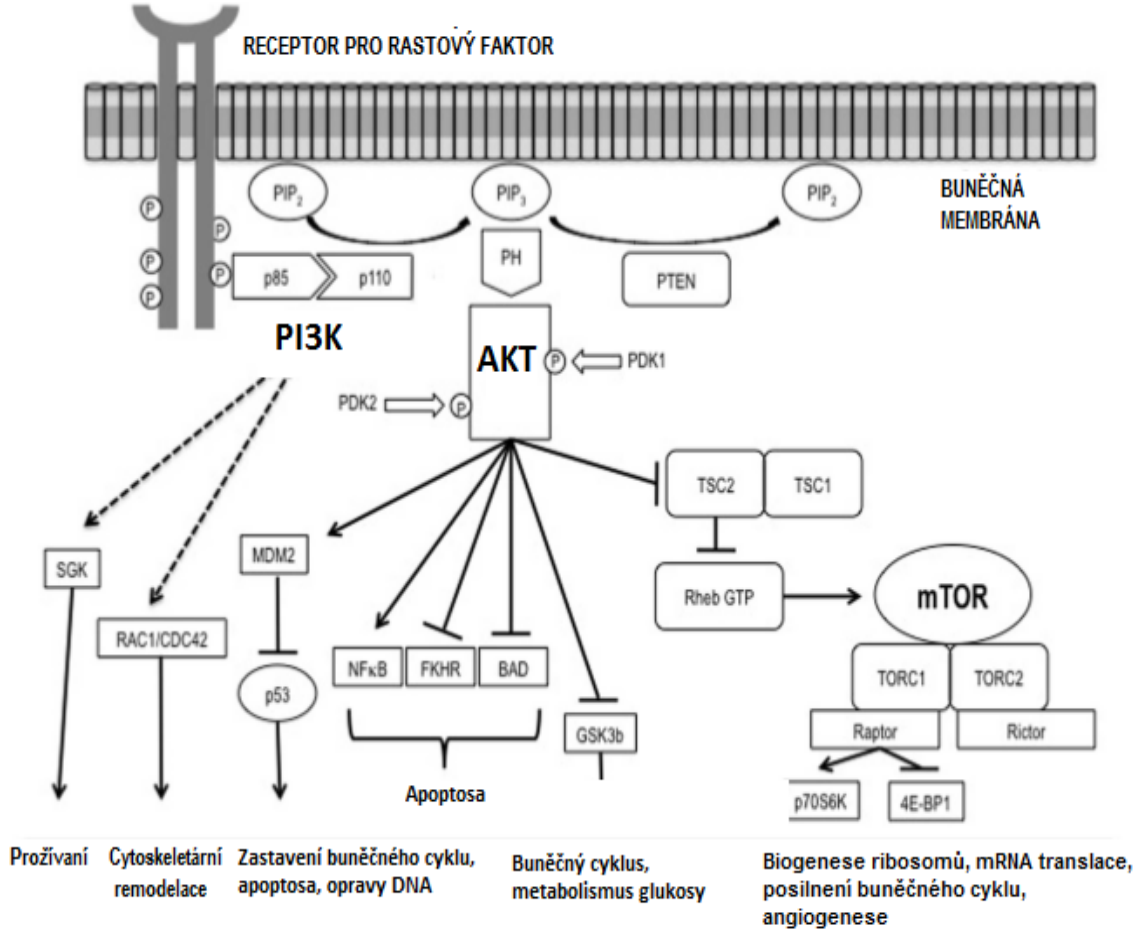
Signální kaskáda PI3K/AKT/mTOR způsobuje stimulaci buněčného růstu a blokaci programované buněčné smrti. Mutace a isoformy různých komponentů této dráhy přispívají k jejím abnormalitám, které v konečném důsledku způsobí rozvoj řady nádorových onemocnění u pacientů [77]. Nadměrná aktivace dráhy je spojená s procesem a progresí karcinogenese, narušením kontroly buněčného růstu nebo nadměrnou angiogenesí a rezistencí na medikament [78].

První krok, jenž vede k aktivaci této signální dráhy je fosforylace membránového proteinového receptoru pro růstový faktor prostřednictvím enzymu tyrosinkinasa. Takto fosforylovaný receptor interaguje s fosfatidyl-3-inozitol kinasou (PI3K) dvěma způsoby:

a) Přímo- přes GTPasu RAS
b) Nepřímo- interakcí s adaptorovým proteinem, např. insulin receptorový substrát (IRS1)

Nastane konformační změna PI3K, její regulační podjednotka p85 ztratí svůj inhibiční účinek a dojde tak k aktivaci katalytické podjednotky p110. Tato změna způsobí, že je PI3K schopná fosforylovat molekulu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na jeho 3´ hydroxylovém konci, čímž vznikne trojfosfátová forma fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP3) [79]. Pozitivní regulátor této dráhy je PTEN (z angl. phosphatase and tensine homolog), který má charakter fosfatásy a může tedy PIP3 defosforylovat, a tím blokovat jeho transdukční signál [80].

Molekula PIP3 plní důležitou úlohu při procesu aktivace AKT, serin/threoninové kinasy. PIP3 společně s proteinem PDK1 (z angl. Phosphoinositide dependent protein kinase 1) fosforyluje T308 a S473 v molekule AKT, aktivuje ho a ten se následně podílí na regulaci a ovlivňování velkého množství molekul účastnících se na procesu přežívání buněk, proliferaci, progresi buněčného cyklu nebo metabolismu GLK [81]. Průběh signální kaskády je zobrazen na Obrázku 6.



Obrázek 6. Zjednodušené schéma PI3K/ AKT/ mTOR signální kaskády

Receptor pro růstový faktor v buněčné membráně je fosforylován enzymem tyrosinkinasou. Fosforylace způsobí interakci receptoru s molekulou fosfatidyl-3-inositol kinasou (PI3K), která se aktivně podílí na konverzi fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP_2) na fosfoatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP_3). PIP_3 spolu s kinasou PDK1/2 fosforyluje molekulu AKT. Ta dále působí na velké množství molekul, které mají v konečném důsledku různé efekty. Nejdůležitější molekula je serin/threoninová kinasa mTOR podílející se na translaci proteinů, progresi buněčného cyklu a angiogenese. Upraveno podle [82].

3.3.1. Signalizace mTOR

mTOR (z angl. mechanistic target of rapamycin) je S/T kinasa, která je v lidském organismu kódovaná genem *MTOR*. Je členem rodiny fosfatidylinositol-3-kinas (PI3K) a rozlišujeme dva proteinové komplexy mTORC1 a mTORC2 podílejících se na regulaci rozdílných buněčných procesů [85]. mTOR kinasa může být abnormálně aktivována mutací v genech zodpovědných za aktivující proteiny (např. EGFR, PDGFR, PI3K) [83].

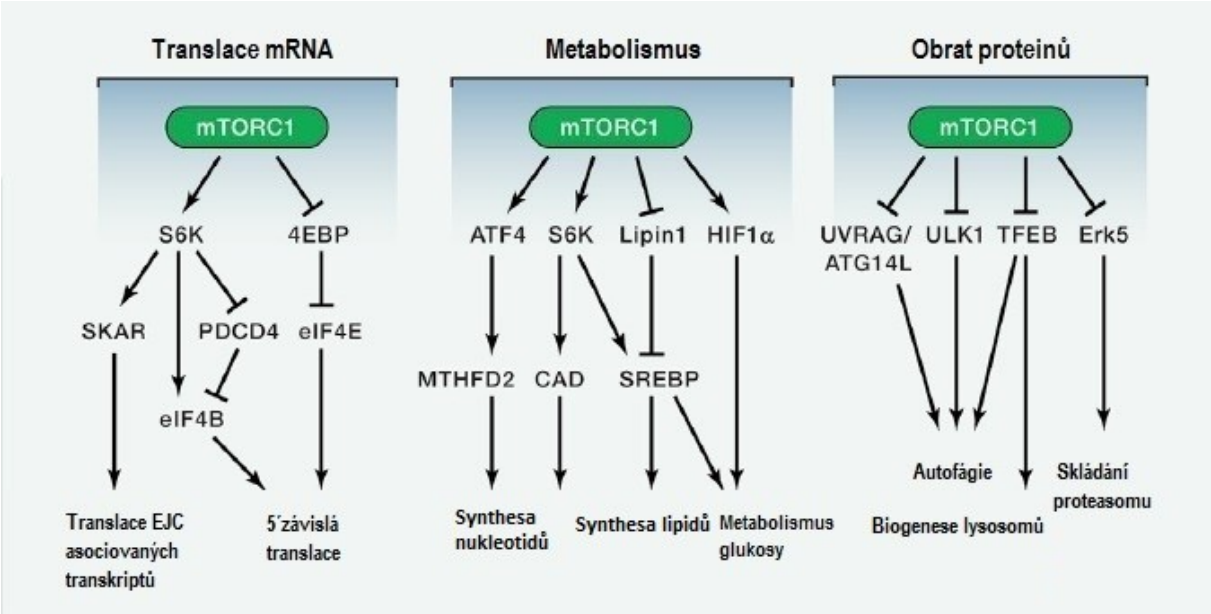
mTOR představuje bod, ve kterém se sbíhá více signálních drah, a proto je považován za velmi lákavý terapeutický cíl. PI3K/AKT/mTOR signální dráha je velmi komplexní, a tak umožňuje vícestupňové inhibice, které představují velký terapeutický význam [83].

- **Proteinový komplex mTORC1**
  mTORC1 je definovaný třemi svými komponenty: mTOR, RAPTOR (z angl. regulatory protein associated with mTOR) a mLST8 (z angl. mammalian lethel with Sec13 protein 8). Kromě těchto jádrových složek obsahuje i dvě inhibiční podjednotky PRAS40 (z angl. proline rich Akt substrate of 40 kDa) a DEPTOR (z angl. DEP domain containing mTOR interacting protein) [84].

- **Proteinový komplex mTORC2**
  mTORC2 obsahuje také složky mTOR a mLST8, ale třetí komponent RAPTOR je nahrazen za RICTOR (z angl. rapamycin insentive companion of mTOR). Dále obsahuje DEPTOR a regulační podjednotky mSIN1 a Protor1/2 [84].

mTORC1 signální dráhy

Signální kaskády komplexu mTORC1 se v buňce podílí u více biochemických procesů, které v konečném efektu stimulují především buněčný růst. Patří zde procesy ovlivňující translaci mRNA, metabolismus a proteinový obrat, viz Obrázek 7 [84,85].



Obrázek 7. Zjednodušené schéma signálních drah řízených komplexem mTORC1
mTORC1 ovlivňuje translaci mRNA, metabolismu i obrat proteinů. Na levém schématu můžeme pozorovat signální kaskády ovlivňující translaci transkriptů asociovaných s komplexem exonových spojů (EJC) a 5‘ závislou translaci, které podporují zvýšenou proteosynthesu v buňkách. Prostřední schéma popisuje signální kaskády ovlivňující metabolismus nukleotidů, lipidů a sacharidů, tedy metabolitů potřebných při proliferaci a buněčném růstu. Pravé schéma zobrazuje mTORC1 řízenou inhibici signálních drah přispívajících ke katabolismu proteinů. Upravené podle [84].

mTORC1 a vliv na metabolismus

mTORC1 podporuje *de novo* synthesu lipidů za pomoci proteinu SREBP (z angl. sterol responsive element binding protein). mTORC1 signalizace může aktivovat SREBP přes dva různé mechanismy:

a) S6K mechanismus
b) fosforylací substrátu LIPIN1, který inhibuje SREBP za nepřítomnosti mTORC1 signalizace [86]

mTORC1 podporuje taky synthesu nukleotidů nezbytných pro replikaci DNA a biogenesi ribosomů v rostoucích a proliferujících buňkách. Komplex zvyšuje ATF4-dependentní expresi MTHFD2, jež představuje klíčovou složku mitochondriálního tetrahydrofolátového cyklu a poskytuje tak uhlíkové jednotky pro synthesu purinu [86]. Komplex taky působí na S6K kinasu, která fosforyluje a zároveň aktivuje karbamoylfosfát synthetasu (CAD), rozhodující složku pro *de novo* pyrimidinovou synthesu [88].

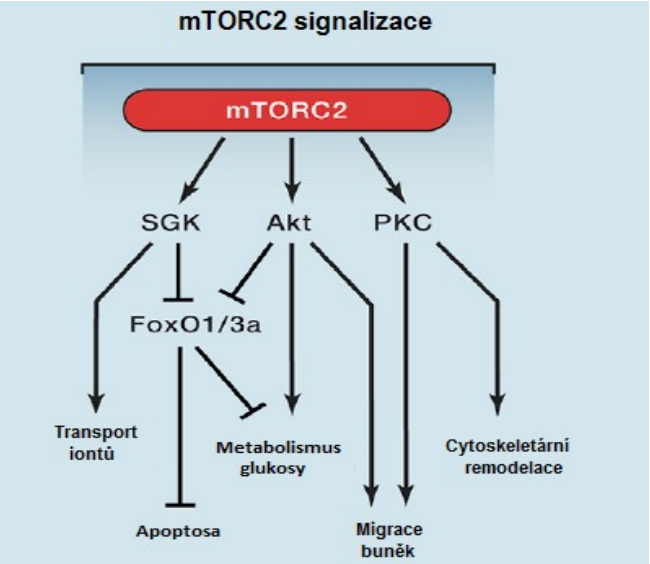
mTORC1 má vliv i na metabolismu glukosy, jejíž produkty nepostupují až do terminálního procesu oxidativní fosforylace, ale zůstávají na úrovni glykolysy, což má za následek snazší začlenění živin do nové biomasy. mTOR1 zvyšuje translaci transkripčního faktoru HIF1α, který řídí expresi několika glykolytických enzymů, především PFK. Taky aktivace SREBP závislá na mTORC1 vede ke zvýšení toku sacharidových jednotek do PD, využívající uhlíky z glukosy při generování $NADPH+H^+$ a dalších meziprodukty metabolitů potřebných k synthese nukleotidů, proliferaci a růstu [86].

mTORC2 signální dráhy

mTORC2 se podílí na procesech buněčné proliferace a jejich přežití, viz Obrázek 8. Dráha aktivace mTOR závisí na signalizaci řízené mitogenem za pomoci PI3K/AKT, nicméně nové poznatky poukazují i na alternativní aktivaci řízenou přes RAS/RAF/MEK/ERK signální dráhu. Komplex je méně citlivý na inhibitor rapamycin v porovnání s mTORC1, a jeho působení jak po fysiologické, tak i patologické stránce nebylo zcela objasněno [89].

Komplex aktivuje a fosforyluje SGK (z angl. serum and glucocorticoid induced protein kinase) kinasu, která se podílí na regulaci transportu iontů [93].

Fosforylace a aktivace proteinu AKT, klíčového efektoru signalizace insulin/PI3K, patří mezi nejdůležitější úlohy mTORC2. Akt ovlivňuje jak procesy migrace buněk, proliferaci tak i metabolismus glukosy a inhibuje buněčnou apoptosu. mTORC2 fosforyluje AKT na S473, což způsobuje jeho úplnou aktivaci [84,91]. AKT pak fosforyluje a inhibuje několik dalších klíčových molekul.



Obrázek 8. Jednoduché schéma signálních drah komplexu mTORC2

Na obrázku je možné pozorovat vícero signálních drah, které ve finálním efektu podporují remodelaci cytoskeletu, migraci buněk, metabolismus glukosy, transport iontů a inhibici apoptosy. Upraveno podle [84].

3.3.2. Propojení mTOR signalizace a Hippo signální dráhy

Hippo signální dráha a mTOR signální dráha patří mezi dvě hlavní signální kaskády, které jsou schopné koordinovaně regulovat růst a proces proliferace v buňkách. Deregulace těchto drah napomáhá k rozvoji onkogenese, a proto mají důležitou úlohu v tomto procesu. Nedávné výzkumy potvrdily určitou interakci mezi těmito dráhami.

Propojujícím článkem mezi dráhami byl uveden protein AMOTL2 z rodiny angiomotinů, který se podílí na aktivní inaktivaci YAP tím, že stabilizuje jeho lokalizaci v cytoplasmě a brání jeho translokaci do jádra. AMOTL2 zabezpečuje přímou interakci s aktinovým cytoskeletem a YAP, čímž podporuje jeho fosforylaci prostřednictvím Hippo signální dráhy [91]. Tímto způsobem AMOTL2 inhibuje transkripci, potlačuje buněčný růst a proliferaci.

Výzkumy potvrdily schopnost mTORC2 negativně regulovat aktivitu AMOTL2. mTORC2 a AMOTL2 vzájemně interagují prostřednictvím RICTOR a mTORC2 fosforyluje S760 v AMOTL2 molekule. Tato regulační událost postačí k blokaci vazby AMOTL2 s YAP a stimuluje tak translokaci YAP do jádra a následnou genovo expresi. Fosforylace S760 je potřebná k YAP indukované transformaci, buněčnému růstu, migraci a invazivnosti *in vivo* u myší [91].

3.3.3. mTOR signalizace a rakovina

Má-li buňka za normálních podmínek zabezpečenou adekvátní dodávku glukosy a jiných živin, je mTOR aktivovaný a podporuje synthesu buněčných proteinů (cyklin D, HIF1-α, survivin, glukosový transporter GLUT1 a další). V případě nedostatku živin je mTOR inaktivní a proteinová synthesa je inhibovaná. V čase nutričního nedostatku se aktivuje tzv. samopožírání (autofagie).

V nádorových buňkách bývá mTOR nepřiměřeně aktivován účinkem některých signálních drah, a tak nedochází k inhibici proteinové synthesy v nádorových buňkách. Buňky s nepřiměřeně aktivovanou molekulou mTOR mají zvýšenou spotřebu glukosy a vyšší schopnost glykolysy, což má za následek zvýšenou proliferaci.

Jak již bylo řečeno, mTORC1 funguje jako efektor u více onkogenních drah, včetně dráhy PI3K/AKT a RAS/RAF/MEK/ERK. Tyto dráhy často podléhají mutacím, které přispívají k hyperaktivaci komplexu mTORC1 ve vysokém procentuálním zastoupení u pacientů s rakovinou [84].

V minulém desetiletí se uskutečnilo několik studií, které zkoumaly úlohu signální dráhy PI3K/AKT/mTOR během kontroly buněčného metabolismu a glykolysy v nádorových buňkách. Akt patří mezi hlavní hnací síly Warbugova efektu, protože zvyšuje příjem glukosy za pomoci regulace transportérů glukosy. Kromě tohoto i jiné složky dráhy PI3K/AKT/mTOR koordinují příjem živin, včetně GLK, glutaminu, nukleotidů a lipidů, aby podpořily zvýšení proliferační a růstové potřeby rakovinových buněk [82,84].

Aktivace této signální dráhy přeprogramuje buněčný metabolismu, a proto se studie nyní zaměřují na její inhibici, která by mohla představovat značný terapeutický přínos pro pacienty. První mTOR inhibitory schválené a použité v klinické praxi při léčbě rakoviny patří do třídy rapamycinových derivátů, známých jako rapalogy. Nicméně tyto rapalogy byly v klinické praxi méně úspěšné, než se prvotně předpokládalo na základě předklinických studií [94-96].

Toto zjištění pomohlo potvrdit názor, že rapalogy mají převážně cytostatické, a ne cytotoxické účinky. Inhibice mTORC1 také indukuje autofagii, která může napomoci přežívání rakovinových buněk během nedostatku živin a nedostatečné vaskularizaci. Inhibice mTORC1 zároveň podporuje makropinocytózu, čímž se internalizují a degradují extracelulární proteiny tak, aby poskytly aminokyseliny pro vyhladovělé nádory [96]. Všechny tyto údaje naznačily, že kombinace rapalogu s inhibitory autofagie by mohla zlepšit

účinnost léčby rakoviny, což se také následně podařilo potvrdit klinickou studií v roce 2014 u pacientů s melanomem, kde bylo zaznamenáno výrazné zlepšení [97].

Za účelem odstranění některých nevýhod a nedostatků rapalogů byly vyvinuty i rapalogy tzv. „druhé generace“, ATP-kompetitivní katalytické inhibitory proti mTOR, které jsou momentálně stále v klinické studii. Použití těchto inhibitorů v předklinických a předběžných klinických testech vykazovalo značnou míru účinnosti, ale na druhou stranu vyvolaly i obavy z toxicity užité dávky [98].

Inhibitor mTOR neboli RapaLink, patří do nedávno popsané tzv. třetí generace léčiv. Sloučenina RapaLink obsahuje ATP kompetitivní inhibitor mTOR chemicky vázaný na rapamycin, a tak umožňuje inhibici mTOR mutantů, které jsou rezistentní na samotný rapamycin [99].

4. Cíle diplomové práce

1. Vliv shikoninu na buněčnou signalizaci v leukemických buňkách.

2. Imunoprecipitace MST1 proteinu z leukemických buněk.

3. Charakterizace posttranslačních modifikací MST1 kinasy v neaktivním a aktivovaném stavu pomocí hmotnostní spektrometrie.

5. Materiál a metody

5.1. Biologický materiál

Leukemické nádorové T- lymfocyty linie Jurkat klon E6.1.

5.2. Přístroje a příslušenství

Aparatura na SDS elektroforézu; *BIORAD* (USA)

Aparatura pro přenos proteinů; *BIORAD* Trans-blot ® SD Semi-dry transfer cell (USA)

Automatické pipety; *RAININ* Pipet-LITE XLS (USA, Kanada)

Automatické počítadlo buněk; *Logos Biosystems Luna II™ Automated Cell Counter (USA)*

Bürkerova komůrka; P-lab

CCD kamera; *BIORAD* ChemiDoc™MP Imaging Systém (USA)

Centrifuga; ALC PK 110 (Itálie)

Centrifuga; *Eppendorf* 5424R, (Německo)

CO_2 inkubátor; *Panasonic* (Japonsko)

Elektrický zdroj; *BIORAD* PowerPac™ HC (USA)

Filtrační papír; *BIORAD* Extra Thick Block Paper (USA)

Hmotnostní spektrometr (HS); Thermo Orbitrap Fusion with nano LC (USA)

Hluboce mrazící box; *Panasonic* MDF DV500VH-PE (Japonsko)

Kultivační lahve; *TPP*® Tissue culture Flask 75, 150 a 300 cm^2 (Švýcarsko)

Laminární box; *JOUAN* MSC 12 (Francie)

Magnetický stojan; *Bio Labs* 6 Tube Magnetic Separation Rack (UK)

Mikrotitrační destičky; *TPP*® Tissue culture Testplate 96F (Švýcarsko)

Nástavec na pipety; *Pipetus*® HIRCHMANN LABORGERATE (Evropa)

Nitrocelulosová membrána (póry 40µm); *SANTA Cruz Bioctechnology* (USA)

Plastové špičky na automatické pipety; *RAININ* Precision Pipette Tips (USA)

Rotátor; *BIOSAN* Bio RS-24 Mini Rotator (EU)

Spektrofotometr; *BioTek* Synergy HT (USA)

Třepačka a termostat; *BIOER* Mixing Block MB-102 (Čína)

Třepačka; *Benchmark Scientific Inc.* (Taiwan)

Váhy; *KERN*® EMB 600-2 (Německo)

Vakuový koncentrátor a odstředivý evaporátor; *JOUAN* RC10-10 (Francie)

Vortex: *Biosan* Vortex V-1 plus (USA)

5.3. Chemikálie

4-ethylmorfolinacetat; *Sigma Aldrich*

Akrylamid; *BIORAD*

Acetonitril (AcN); *Sigma Aldrich*

Coomassie™ Brilliant Blue; *Sigma Aldrich*; (45% methanol; 10% HAc; H_20; 0,25% Commasie briliantová modř)

Destilovaná voda

Dithiothreitol (DTT); *Sigma Aldrich*

Dodecylsíran sodný (SDS); *BIORAD*

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA); *Sigma Aldrich*

Ethanol; *P-LAB*

Fetální bovinní serum (FBS); *Gibco*

Hovězí sérový albumin (BSA); *Serva*

Kit na kvantifikaci proteinů; *Thermo Fisher SCIENTIFIC*; Pierce® BCA Protein Assay kit

Kit pro Co-Imunoprecipitaci; *Thermo Fisher SCIENTIFIC* Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit

Komerčně připravený 4-15% gel; *BIORAD* Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels

Kyselina kumarová (KK); *Sigma Aldrich*

Kyselina octová (HAc); *Sigma Aldrich*

Luminol; *Sigma Aldrich*

Médium; *LONZA* BioWhittaker® RPMI 1640 s L-Glutamínem,

Odtučněné sušené mléko; *BIORAD* Blotting-Grade Blocker

Odbarvovací směs pro CBB; (55% H_2O; 35% ethanol; 10% HAc)

Peroxodisíran amonný (APS); *Sigma Aldrich*

Peroxid vodíku 0,018%; *Sigma Aldrich*

PBS pufr; *Sigma Aldrich* (0,15 M NaCl; 0,3 mM KCl; 1 mM Na_2HPO_4; 0,2 mM K_2HPO_4; pH 7,4)

Primární protilátka Anti-STK4 Mouse monoclonal IgG; *Sigma Aldrich*

Primární protilátka MST1Rabbit monoclonal Ab IgG; *Cell Signalling*

Primární protilátka Actin Goat polyclonal IgG; *SANTA Cruz Biotechnology*

Primární protilátka YAP Mouse monoclonal IgG; *Sigma Aldrich*

Primární protilátka C-MYC Rabbit polyclonal IgG; *Cell Signaling*

Primární protilátka p-ERK Rabbit polyclonal IgG; *SANTA Cruz Biotechnology*

Primární protilátka p-S6K Rabbit polyclonal IgG; *SANTA Cruz Biotechnology*

Protein G PLUS- Agarosa; *Santa Cruz Biotechnology*

Proteasový a fosfatasový koktejl; *Thermo Fisher SCIENTIFIC*

Pufr pro elektroforézu; 10x TGS (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3); *BIORAD*

Přenosový pufr; Bjerrum Schafer-Nielsen (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% methanol; pH 9,2)

RIPA pufr (150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS; 50 mM Tris o pH 8,0)

Sekundární protilátka Goat anti-rabbit polyclonal IgG; *Santa Cruz Biotechnology*

Sekundární protilátka Rabbit anti-goat polyclonal IgG; *Santa Cruz Biotechnology*

Sekundární protilátka Goat anti-mouse polyclonal IgG; *Santa Cruz Biotechnology*

Standard pro elektroforézu*;* Precision Plus Protein^{TM} All Blue Standards; *BIORAD*

Substrát; *Thermo Fisher SCIENTIFIC*; Super Signal West Femto Trial Kit

Shikonin; *Sigma Aldrich*

Tetramethylethylendiamin (TEMED); *Sigma Aldrich*

Triton X-100; *Active Motif*

tris(hexomethyl)aminomethan pufr (Tris;0,1M; pH 8,8)

TTBS pufr (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% v/v Tween 20; pH 7.6)

Vzorkový pufr; 4x Leammli (2,4 ml 1M Tris o pH 6,8; 0,8 g SDS; 4 ml 100% glycerol; 0,01% bromfenolová modř; 1 ml merkaptoethanolu; 2,8 ml H_2O)

5.4. Postup při sledování vlivu shikoninu na buněčnou signalizaci

5.4.1. Kultivace a pasážování rakovinových buněk linie Jurkat

Nádorové leukemické buňky linie Jurkat byly inkubované v CO_2 inkubátoru (*Panasonic*) při konstantní teplotě 37 °C, v atmosféře 5% CO_2. Buňky byly kultivované v BioWhittaker®RPMI 1640 médiu, jehož složení je rozepsáno v Tabulce 1. Koncentrace buněk nesměla přesáhnout hranici 10^6 buněk/ml, proto byl časový interval pasážování tomuto požadavku přizpůsoben.

Tabulka 1. Složení BioWhittaker®RPMI média.

BioWhittaker®RPMI 1640 médium *(Lonza)*	• Antibiotika (100 jednotek penicilinu a 0,1 mg streptomycinu na 1ml média) • 5 mM L-glutamin • 10% Fetální hovězí sérum

5.4.2. Příprava buněčných proteinů

Jurkat buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích při podmínkách uvedených v kapitole 5.4.1. V prvním kroku bylo zapotřebí spočítat množství buněk, k tomu byl použit přístroj Luna IITM Automated Cell Counter. Pipetovalo se 10 µl buněk a 10 µl činidla ze zkumavky, odkud se následně odebralo 10 µl směsi buněk a činidla, která byla napipetována do počítací komůrky. Výsledný počet buněk byl 480 000 buněk/ ml.

Dále bylo nutné pracovat s koncentrací 300 000 buněk/ml pro přípravu 12 kultivačních lahví s buňkami o celkovém objemu média 15 ml. Z tohoto důvodu bylo cca 120 ml buněk centrifugováno (4 min; pokojová teplota; 400 rcf) centrifuga ALC PK110. Pelet byl rozsuspenodován v 60 ml média BioWhittaker®RPMI 1640. Následně byla tato směs rozpipetována po 5 ml do 12 kultivačních lahví, do každé lahve bylo přidáno 10 ml čerstvého média. Celkový objem v kultivační lahvi byl tedy 15 ml. Do kultivačních lahví byla přidána látka shikonin, jeji objem a výsledná koncentrace je uvedená v Tabulce 2. Buňky se kultivovaly se shikoninem po dobu 2 hod, 4 hod a 6 hod při 37 °C v CO_2 kultivátoru. Po tomto časovém intervalu byly jednotlivé lahve zpracoványa za účelem izolace buněčných proteinů.

Tabulka 2. Příprava kultivačních lahví za účelem získaní cytosolických frakcí jednotlivých vzorků.

VZORKA	2 HOD	4 HOD	6 HOD	Objem přidané látky
KONTROLA	15 ml	15 ml	15 ml	x
SHIKONIN	15 ml	15 ml	15 ml	6 µl (2 µM shikonin)

Buňky byly stočeny (4 min; pokojová teplota; 400 rcf) centrifuga ALC PK110. Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet se rorezsuspendoval v 900 µl PBS pufru, rozresuspendovaný pelet byl následně přenesen do 1,5 ml zkumavky a zvortexován. Zkumavka s peletem v PBS pufru byla centrifugována (4 min; 4 °C; 400 rcf) centrifuga *Eppendorf* 5424R. Supernatant byl opět odstraněn a buněčný pelet rozresuspendován ve 100 µl roztoku RIPA pufru (150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS; 50 mM Tris pH 8,0) spolu s fosfátovými a proteasovými inhibitory. Jednotlivé vzorky byly inkubovány po dobu 30 min na ledu, přičemž každých 5 min se vortexovaly. Po inkubační době byly vzorky centrifugovány (10 min; 4 °C; 14000 rcf) centrifuga 5424R a supernatant byl přenesen do nové 1,5 ml zkumavky. Takto připravené vzorky byly náležitě označeny a daly se zamrazit do hluboce mrazícího boxu (*Panosonic*) na -80 °C až do doby dalšího použití.

5.4.3. Kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů

Ke kvantifikaci proteinů, a tedy stanovení jejich koncentrace, byla použita kolorimetrická BCA metoda. K tomuto účelu byl použit komerční kit Pierce®BCA Protein Assay Kit.

Princip této metody spočívá v redukci měďnatého kationtu Cu^{2+} v bazickém prostředí na mědný kationt Cu^{+} s jeho následnou vysokou, citlivou a selektivní kolorimetrickou detekcí kyselinou bicinchoninovou (BCA), přičemž se tvoří fialový reakční produkt vykazující silnou absorbanci při vlnové délce (λ) 562 nm. Závislost koncentrace a rostoucí vlnové délky je téměř lineární, a proto je tato metoda velmi oblíbená při kvantifikaci proteinů.

Z chladničky byly vybrány standardní vzorky označené A-F, celkem 6 vzorků. Vzorky proteinů byly ředěné 5x RIPA pufrem. Objem standardů a 5x ředěných vzorků proteinů pro kolorimetrické stanovení představoval 5 µl, přičemž vzorky proteinů byly připraveny celkem dvakrát, dohromady tedy 24 vzorků, pro přesnější kvantifikaci a lepší kontrolu účinnosti

stanovení jejich koncentrace. Do všech vzorků bylo napipetováno 200 µl reakční směsi BCA, připravené smícháním dvou reakčních složek A- BCA a B – Cu^{2+} kationtů v poměru A:B=50:1. Vzorky se společně s reakční směsí inkubovaly po dobu 15 minut a následně byly přepiptetovány na mikrotitrační destičku detekovány za pomoci spektrofotometru Synergy HT při λ=562 nm, jež určil jejich absorbanci. Koncentrace proteinů jednotlivých vzorků byla stanovena na základě jejích absorbancí a výpočtu z rovnice kalibrační přímky standardů.

5.4.4. SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE – z angl. polyacrylamide gel electrophoresis) s dodecylsíranem sodným (SDS) patří mezi nejoblíbenější a nejčastěji používané elektromigrační metody, které slouží jak k separaci, tak i vizualizaci a případně identifikaci proteinů.

Základ tvoří polyakrylamidový gel, jež vzniká polymerizací polyakrylamidu s N,N´-methylenbisakrylamidem za vzniku prostorové gelové sítě, u níž je možné měnit velikost pórů změnou koncentrace, resp. změnou poměru obou reaktantů. SDS jako aniontový detergent denaturuje proteiny, a všem udělí stejný záporný náboj. Molekule migrují a separují se v elektrickém poli polyakrylamidového gelu podle jejích molekulových hmotností. [56]

Elektromigraci a separaci proteinů předchází příprava dvou gelů:

A. Dělící gel, spodní gel sloužící k separaci proteinů.
B. Zaostřovací gel, vrchní gel sloužící k zaostření elektromigračních zón.

Složení jednotlivých gelů je blíže popsáno v Tabulce 3.

Tabulka 3. Příprava dělícího a zaostřovacího gelu pro SDS- PAGE.

A. 10 % DĚLÍCÍ GEL		B. 10 % ZAOSTŘOVACÍ GEL	
30% Akrylamid	3,300 ml	30% Akrylamid	0,660 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,500 ml	0,5 M Tris pH 6,8	1,260 ml
10% SDS	0,100 ml	10% SDS	0,050 ml
H_2O	4,000 ml	H_2O	3,000 ml
TEMED	0,005 ml	TEMED	0,005 ml
APS	0,100 ml	APS	0,100 ml

Po stanovení absorbance a následném výpočtu koncentrací (mg/ml) proteinů byl proveden přepočet proteinů ve všech vzorcích na výslednou hmotnost 25 µg. Pipetovaný objem proteinů byl následně zředěn RIPA pufrem na výsledný objem 15 µl. Do vzorků byly pipetovány 4 µl vzorkového pufu 4x Leammli s 2- merkaptoethanolem tak, aby celkový objem všech vzorků byl roven 19 µl, složení vzorků viz Tabulka 4.

Tabulka 4. Složení vzorků proteinů pro SDS-PAGE.

Vzorek	Objem vzorků (µl) (přepočet na 25 µg/ml)	RIPA pufr (µl) (doplnění na 15 µl)	Vzorkový pufr (µl)
2 hod Kontrola	8,7	6,3	4
4 hod Kontrola	7,6	7,4	4
6 hod Kontrola	7,6	7,4	4
2 hod Shikonin	12	3	4
4 hod Shikonin	13	3	4
6 hod Shikonin	15	x	4

Takto připravené vzorky byly vloženy na 5 minut do termostatu při teplotě 95 °C, krátce stočeny v centrifuze 5424R a poté byla provedena SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.

Elektroforéza byla provedena přístrojem Mini-PROTEAN® Tetra cell. Po přípravě gelů a vzorků následovala příprava elektroforetické celi, v níž krycí sklo směřovalo vždy dovnitř. Cela, ohraničená skly s gely, a elektroforetická nádoba byly naplněny elektrodovým pufrem

10x TGS (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% w/v SDS; pH 8.3) zředěného vodou v poměru 1:10. Do jamek se postupně nanášelo 5 µl molekulového markeru Precision Plus Protein™ All Blue Standards a 18 µl jednotlivých vzorků. Elektroforéza trvala dohromady 70 min, při prvních 20 min bylo napětí 100 V a v následných 50 min 150 V.

5.4.5. Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu a jejich imunodetekce

Přenos proteinů (z angl. western blot) patří mezi analytické metody. Proteiny jsou po elektroforetické separaci přeneseny z polyakrylamidového gelu na povrch membrány, v našem případě nitrocelulosové, a detekovány interakcí se specifickou protilátkou.

Při našem pokusu byl použit tzv. polosuchý (z angl. semidry) přenos, při kterém je filtrační papír, membrána a gel nasáknut přenosovým roztokem Bjerrum-Schafer-Nielsen (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% methanol; pH 9,2). Tento způsob přenosu je poměrně rychlý a efektivní, jeho největší výhoda spočívá v použitém množství přenosových roztoků.

Po namočení filtračního papíru, nitrocelulosové membrány a gelu do přenosového roztoku, byly tyto složky uloženy do aparatury určené pro přenos proteinu Trans-blot® SD Semi-dry transfer cell v tomto pořadí:

1. Filtrační papír
2. Nitrocelulosová membrána
3. Polyakrylamidový gel s proteiny
4. Filtrační papír

Bylo nezbytné, aby se mezi jednotlivými částmi tohoto „sendviče“ nevyskytovaly vzduchové bubliny, které by zapříčinily snížení účinnosti přenosu proteinů. Samotný transfer probíhal 1 hodinu při napětí 15 V. Umístění katody nahoře a anody dole umožnilo přenos záporně nabitých proteinů (díky SDS) směrem k anodě, tedy směrem dolů na nitrocelulosovou membránu.

Membrána s proteiny se ihned po přenosu promyla v roztoku TTBS (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% v/v Tween 20; pH 7,6) 5 min v třepačce Mixing Block MB-102 a následovala její blokace v roztoku 5% odtučněného, sušeného mléka Blocking Grade Milk v TTBS po dobu 1 hod při pokojové teplotě ve stejné třepačce. Po jedné hodině byla přidána primární protilátka do 10 ml 5% mléka (0,5 g mléka; 10 ml TTBS) anebo do 10 ml 5% BSA

pufru (0,5 g BSA; 10 ml TTBS), viz Tabulka 5. Roztok s primární protilátkou a membrána byly v chladničce inkubovány přes noc při teplotě 4 °C.

Tabulka 5. Název, použitý pufr a objem primární protilátky-

PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	PUFR	OBJEM PROTILÁTKY (do 10 ml pufru)
MST1 rabbit IgG *(Cell Signaling)*	5% BSA	8 µl
YAP mouse IgG *(Sigma Aldrich)*	5% Mléko	10 µl
C-MYC rabbit IgG *(Cell Signaling)*	5% BSA	8 µl
p-ERK rabbit IgG *(Santa Cruz Biotechnology)*	5% Mléko	10 µl
ACTIN goat IgG *(Santa Cruz Biotechnology)*	5% Mléko	10 µl
p-S6K rabbit IgG *(Santa Cruz Biotechnology)*	5% Mléko	10 µl

Druhý den byla membrána vyjmuta z inkubační směsi, třikrát promyta 10 ml TTBS pufru, přičemž každé promytí probíhalo 10 min v třepačce za pokojové teploty. Následně byla membrána inkubována v 10 ml 1% mléka (2 ml 5% mléka; 8 ml TTBS) spolu se 4 µl sekundární protilátky při pokojové teplotě po dobu 45 min v třepačce, viz Tabulka 6.

Tabulka 6. Přehled primární a proti ní použité sekundární protilátky.

PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA (všechny od ***Santa Cruz Biotechnology***)
MST1 rabbit IgG *(Cell Signaling)*	Goat anti- rabbit IgG
YAP mouse IgG *(Sigma Aldrich)*	Goat anti- mouse IgG
C- MYC rabbit IgG *(Cell Signaling)*	Goat anti- rabbit IgG
p- ERK rabbit IgG *(Santa Cruz Biotechnology)*	Goat anti- rabbit IgG
ACTIN goat IgG *(Santa Cruz Biotechnology)*	Rabbit anti-goat IgG
p-S6K rabbit IgG *(Santa Cruz Biotechnology)*	Goat anti- rabbit IgG

Po inkubaci membrány se sekundární protilátkou se opětovně membrána promyla 3x 5 min 10 ml TTBS při pokojové teplotě v třepačce. Použité sekundární protilátky byly konjugovány s křenovou peroxidázou, reportérový enzym umožňující vizualizaci a detekci proteinu. Na detekci bylo zapotřebí připravit dva reakční vzorky A a B, viz Tabulka 7, jejichž

směsí vznikl chemiluminiscenční substrát. Membrána s navázanou sekundární protilátkou byla ponořena do směsi těchto dvou reakčních roztoků A a B, přičemž křenová peroxidasa se podílela na katalytické přeměně chemiluminiscenčního substrátu na nestabilní produkt, který se následně stabilizoval vyzářením určitého kvanta světla. Toto vyzářené světlo bylo detekováno za pomoci CCD kamery ChemiDoc^{TM}MP Imaging System. Výsledky byly uloženy a následně zpracovány viz Kapitola 6.

Tabulka 7. Příprava reakčních roztoků A a B potřebných pro detekci proteinů.

Reakční roztok A (10,044 ml)		**Reakční roztok B (10,007 ml)**	
25 µM Luminol	10 ml	0,1 M Tris pH 8,8	10 ml
4 µM Kyselina kumarová	44 µl	0,018% Peroxid vodíku	7 µl

5.5. Postup imunoprecipitace MST1 proteinu přes Protein PLUS G-Agarosu

Imunoprecipitace patří mezi nejčastěji používané imunochemické metody. Používá se v kombinaci s SDS polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a imunopřenosem proteinů. Tato metoda může být aplikována za různými účely, nicméně v této diplomové práci byla využita zejména za účelem stanovení přítomnosti MST1 proteinu v cytosolické frakci a následnému sledování jeho posttranslačních modifikací.

Kultivace a pasážování rakovinových buněk linie Jurkat

Jurkat buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích při analogických podmínkách uvedených v kapitole 5.4.1.

Příprava cytosolické frakce buněk

V prvním kroku bylo nutné spočítat množství buněk v objemu 10 µl v Bürkerově komůrce (*P-LAB*) pod mikroskopem. Celkový počet buněk po sečtení byl 45 buněk/ 10 µl, tj. 450 000 buněk/ml.

Koncentrace buněk použitá při jejich dalším zpracování byla 450 000 buněk/ ml. Pracovalo se s objemem 50 ml, což je 26,5. 10^6 buněk. Buňky byly stočeny centrifugou ALC PK110 (4 min; pokojová teplota; 400 rcf). Pelet buněk byl následně rozsuspendován v 900 µl

PBS pufru (0,15 M NaCl; 0,3 mM KCl; 1 mM Na2HPO4; 0,2 mM K2HPO4; pH 7,4). Poté byla znovu provedena centrifugace (4 min; pokojová teplota; 400 rcf) centrifuga ALC PK110 a pelet byl rozsuspendován v 500 µl hypotonického pufru spolu s 30 µl koktejlu fosfátových a proteásových inhibitorů (*Thermo Fisher SCIENTIFIC*) a nechal se lysovat 15 min na ledu. Po této době bylo přidáno 25 µl detergentu (Triton X-100) a směs byla centrifugována (30 s; 4 °C; 12 000 rcf) centrifuga *Eppendorf* 5424R. Takto získaný supernatant představoval cytosolickou frakci buněk, ve které se nacházel i MST1 protein.

Kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů

Postup stanovení a vyhodnocení výsledků koncentrace proteinu byl proveden analogicky k postupu popsanému v kapitole 5.4.3. Použili jsme komerční kit Pierce® BCA Protein Assay kit. Jediný rozdíl byl v počtu stanovených vzorků proteinů. Stanovovali jsme neznámou koncentraci 1 vzorku s použitím 6 vzorků standardu se známou koncentrací. Výsledná koncentrace proteinů byla 2,95 mg/ ml.

Imunoprecipitace přes protein G- Agarosu

Z rovnice kalibrační křivky se vypočítala koncentrace proteinů cytosolické frakce. Výsledná koncentrace představovala 2,95 mg/ml. Následně byly připraveny 2 reakční směsi, celkový objem směsí 500 µl. První reakční směs byla kontrolní (375 µl TTBS, 100 µl proteinů cytosolické frakce, 25 µl koktejlu proteasových a fosfatásových inhobitorů), druhá reakční směs byla použita pro stanovení MST1 proteinu (355 µl TTBS, 100 µl proteinů cytosolické frakce, 25 µl koktejlu proteasových a fosfatásových inhibitorů, 20 µl MST1 rabbit IgG primární protilátky). Oba vzorky byly inkubovány přes noc v chladničce při 4 °C.

Následující den byla provedena příprava agarosových kuliček- Protein PLUS G-Agarosa (*Santa Cruz Biotechnology)*. Nejdříve byly tyto kuličky jemně promíchány v rukách a následně 3 min v rotátoru při pokojové teplotě. Po promíchání jsme pipetovali 50 µl agarosových kuliček do 1,5 ml zkumavek. Kuličky byly promyty třikrát 200 µl TTBS pufru (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% v/v Tween 20; pH 7.6), přičemž po každém promytí byla provedena centrifugace (30s; 4°C; 4000 rpm) centrifuga *Eppendorf* 5424R. Připravili jsme si 2 identické vzorky obsahující pouze agarosové kuličky a TTBS pufr v poměru 1:1 o celkovém objemu 100 µl (50 µl agarosových kuliček; 50 µl TTBS). Tato směs se následně pipetovala do předpřipravených vzorků (kontrolní a MST1 protein) a ty pak byly inkubovány přes noc v chladničce. Po inkubaci byly vzorky s G-Agarosou promíchány v rotátoru Bio RS-24 Mini

Rotator (1 hod; 4 °C). Po hodině proběhla krátká centrifugace (30 s; 4 °C; 4000 rpm) centrifuga *Eppendorf* 5424R. Poté se se precizně odpipetoval supernatant tak, aby nedošlo k odpipetování agarosové kuličky s navázaným MST1 proteinem. Kuličky s navázaným MST1 proteinem byly promyty třikrát 450 µl TTBS pufru, po každém promytí byla provedena centrifugace (30s; 4°C; 4000 rpm) centrifuga 5424R. Po finálním odpipetování 450 µl TTBS pufru byly vzorky připraveny pro SDS-PAGE.

SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

Podmínky a průběh elektrické separace v polyakrylamidovém gelu s SDS byly analogické s podmínkami viz kapitola 5.4.4., jediný rozdíl spočíval v použitém objemu 4x Leamli pufru s 2-merkaptoethanolem kdy jsme do vzorků s proteiny napipetovali 5 µl. Vzorky s pufrem byly inkubovány 5 min při 95 °C v termostatu *BIOER* Mixing Block MB-102. Následně byly krátce zvortexovány a stočeny v centrifuze. Gely byly připraveny ručně a nános vzorku na gel probíhal v pořadí: 1. Standard (5 µl); 2. MST1 (20 µl); 3. Kontrola (20 µl).

Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu a jejich detekce

Přenos probíhal analogickým postupem a při identických podmínkách uvedených v kapitole 5.4.5. Protože se jednalo o gel se 2 vzorky, následná velikost použité nitrocelulosové membrány (SANTA Cruz Bioctechnology; póry 40µm) s přenesenými proteiny byla menší v porovnání s membránami v kapitole 5.4.5. Z tohoto důvodu byly použity i menší objemy látek a protilátek při přípravě 5% mléka, 5% BSA pufru, 1% mléka. Příprava roztoků pro imunodetekci vzorků je uvedena v Tabulce 8. Proces detekce a vyhodnocení vzorků probíhal stejně jako v kapitole 5.4.5 za pomoci CCD kamery ChemiDoc^{TM} MP Imaging Systém.

Tabulka 8. Příprava roztoků pro imunodetekci přenesených proteinů.

5% Mléko	0,25g mléka; 5ml TTBS
5% BSA pufr	0,25 g BSA, 5ml TTBS, 4 µl primární protilátky MST1 Rabbit IgG
1% Mléko	1ml 5% mléka; 4 ml TTBS 2 µl sekundární protilátka Goat anti-rabbit

5.6. Imunoprecipitace MST1 proteinu přes magnetické kuličky

Navázaní protilátky na magnetické kuličky

Následující protokol popisuje navázání protilátky proti MST1 na epoxidovou směs magnetických kuliček Dynabeads® M-270. Množství použitých epoxidů Dynabeads® M-270 záviselo na následném počtu a rozsahu vzorku pro Co-IP. Pracovala jsem podle protokolu Dynabeads® Co- Immunoprecipitation Kit.

Protože finální vzorek byl detekován barvením Commasie™ Brilliant Blue navážila jsem podle protokolu 7,5 mg Dynabeads® M-270 magnetických kuliček do 1,5 ml Ependorf zkumavky. Použité množství protilátky proti MST1 (Anti- STK4 Mouse monoclonal IgG, *Sigma Aldrich*) představovalo 80 µl na 7,5 mg kuliček.

V dalším kroku se odvážené množství kuliček promylo v 1 ml roztoku C1 jemným pipetováním a vortexováním. Směs se položila do magnetického stojanu na dobu 1 min, kuličky se odseparovaly na stěnu zkumavky a všechen přebytečný objem C1 byl následně pipetou odsán. Poté jsem si připravila reakční směs, viz Tabulka 9, k navázání protilátky proti MST1 na magnetické kuličky.

Tabulka 9. Hmotnost kuliček a objemy reaktantů reakční směsi k navázání protilátky na magnetické kuličky.

Dynabeads® M-270 magnetické kuličky	7,5 mg
Objem C1	295 µl
Objem Ab	80 µl
Objem C2	375 µl
Výsledný objem	**750 µl**

Reakční směs byla následně resuspendována pipetováním a jemným vortexováním. Kuličky se inkubovaly s reakční směsí po dobu 16-24 hod při teplotě 37 °C v rotátoru.

Druhý den se reakční směs položila do magnetického stojanu na 1 min, magnetické kuličky s navázanou protilátkou se odseparovaly na stěnu zkumavky a supernatant reakčních pufrů byl odebrán pipetou.

Následovalo několik kroků, které se skládaly z promývání kuliček s protilátkou reakčními pufry z komerčního kitu. Nejprve se kuličky promyli 800 µl HB pufru, HB jsme

jemně pipetou rozsuspendovali spolu s kuličkami, směs se separovala 1 min v magnetickém stojanu a odstranil se supernantant. V dalším kroku se promyly 800 µl LB pufru stejným způsobem jako v předchozím kroku. Směs se jemně resuspendovala, položila na magnetický stojan a odstranil se supernatant. Stejným způsobem jsme postupovali i při krátkém promývání kuliček 800 µl SB pufru, postup s SB roztokem jsme zopakovali dvakrát. Zkumavku jsme pokaždé položili do magnetického stojanu, odseparovali kuličky od roztoku a následně roztok odsáli pipetou. Následovalo dlouhé promývání s 800 µl SB pufru, při kterém se směs kuliček a pufru inkubovala 15 min při pokojové teplotě v rotátoru. Po inkubaci se směs položila do stojanu, odpipetovali jsme supernantant SB pufru a Dynabeads s navázaným MST1 byly připraveny k použití.

Dynabeads® M-270 magnetické kuličky se daly použít vícekrát. Byly skladovány ve 750 µl SB pufru spolu s 7,5 µl 0,2% azidu sodného NaN_3 v chladničce při +4 ˚C až do potřeby jejich opětovného použití. Před dalším použití jsme je promývali 0,1% BSA v PBS (1ml PBS; 0,001 g BSA) 5 min v rotátoru při pokojové teplotě.

Lyse buněk prostřednictvím detergentu

Pracovali jsme podle protokolu komerčního kitu Dynabeads® Co Immunoprecipitation Kit. Lýze buněk předcházela příprava extrakčního roztoku, jehož složení viz Tabulka 10.

Tabulka 10. Příprava extrakčního roztoku.

5x IP	2 ml
dH_2O	8 ml
NaCl (100 mM)	0,058 g
Koktejl inhibitorů proteáz a fosfatáz	100 µl

Buňky byly kultivovány při stejných podmínkách jako v předcházejících případech, viz kapitola 5.4.1. Do dvou kultivačních lahví, které obsahovaly 150 ml buněk, byl pak přidán Shikonin o výsledné koncentraci 2 µM (zásobní koncentrace 25mM; ředění 12 500x; 150 000 µl/ 12 500 = 12 µl shikoninu). Kultivace buněk a shikoninu trvala 2 hod v CO_2 inkubátoru při teplotě 37°C a v atmosféře 5% CO_2. Následně byly buňky (A. Buňky a shikonin; B. Kontrola) přeneseny do prázdných zkumavek a centrifugovány (4min; pokojová teplota; 400 rcf) centrifugou ALC PK110. Po centrifugaci byl ze zkumavek odstraněn supernantant a pelet byl následně rozsuspendován v 900 µl roztoku PBS (0,15 M NaCl; 0,3 mM KCl; 1 mM

Na_2HPO_4; 0,2 mM K_2HPO_4; pH 7,4). Tento roztok peletu a PBS byl ze všech zkumavek přenesen do jedné, nově odvážené zkumavky. Zkumavka byla opět centrifugována (4 min; pokojová teplota; 400 rcf), centrifuga ALC PK110. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a zkumavka s peletem byla znovu zvážena. Tímto způsobem byla zjištěna hmotnost buněčného peletu. Buněčný pelet byl poté rozsuspendován v extrakčním roztoku v poměru 1:9 (hmotnost buněčného peletu (mg): objemu extrakčního roztoku (µl)); shrnutí Tabulka 11.

Hmotnost zkumavky s peletem- hmotnost zkumavky = hmotnost buněčného peletu

A. 7,5172 g – 7,0648g = 0,452 g = 452 mg (Buňky a shikonin)
B. 7,5397 g – 7,0956 g = 0,504 g = 504 mg (Kontrola)

Příprava extrakční směsi

A. 1: 9 = 452 mg (pelet): 4068 µl (extrakčního roztoku)
B. 1: 9 = 504 mg (pelet): 4500 µl (extrakčního roztoku)

Tabulka 11. Shrnutí hmotností a objemů extrakčních roztoků pro A, B vzorek.

VZOREK	HMOTNOST PRÁZDNÉ ZKUMAVKY (g)	HMOTNOST ZKUMAVKY S PELETEM (g)	HMOTNOST PELETU (mg)	OBJEM EXTRAKČNÍHO ROZTOKU (µl)
A. Buňky a shikonin	7,0648	7,5172	452	4068
B. Kontrola	7,0956	7,5397	504	4500

Směs byla inkubována 15 min v ledu. Po uplynulé době byla provedena centrifugace (5 min; 4°C; 2600 rpm), centrifuga 5424R. Supernatanty obou cytolosických frakcí buněk byly po centrifugaci přeneseny do nových zkumavek a ihned zpracovány podle postupu pro Co-imunoprecipitaci.

Co- Imunoprecipitace

Vzorky buněk byly zpracovány podle postupu z komerčního kitu Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit pro analyzování vzorků pomocí Coomassie™ Brilliant Blue.
Co-Imunoprecipitaci (Co-IP) předcházela příprava tří Co-IP roztoků, které byly uchovány v ledu až do doby jejich použití:

1. Extrakční roztok (EB) viz Tabulka 10.
2. LWB roztok (z angl. Last Wash Buffer) (LWB) (5x LWB; dH_2O) viz Tabulka 12.
3. HPH EB roztok (HPH EB) (0,5 mM EDTA; 0,5M NH_4OH; dH_2O) viz Tabulka 13.

Tabulka 12. Příprava LWB pufru.

5x LWB	1,8 ml
dH_2O	7,2 ml

Tabulka 13. Příprava HPH EB pufru

0,5 mM EDTA	10 µl
0,5 M NH_4OH	338 µl
dH_2O	9,652 ml

Následoval transfer 7,5 mg Dynabeads® M-270 Epoxy do nové zkumavky. Kuličky byly promyty v 900 µl EB, následně byla zkumavka vložena do magnetického stojanu a směs se separovala po dobu 1 min, poté byl supernatant EB odpipetován. Kuličky s navázanou MST1 protilátkou byly po propláchnutí rozsuspendovány vzorkem buněčného lyzátu, který byl připraven dle postupu uvedeného výše. Vzorky obsahující kuličky s navázaným MST1 byly inkubovány 30 min při 4 °C v rotátoru. Po inkubaci byly vzorky vloženy opět do magnetického stojanu, směs se separovala 1 min a odstranil se supernatant. Kuličky se následně promyly v 900 µl EB jemným pipetováním, vložily do magnetického stojanu a odstranil se supernatant EB. Tento krok byl proveden celkem třikrát. Důležité bylo, aby se vzorky nevortexovaly, protože by mohlo dojít k narušení vazeb mezi MST1 a protilátkou vázanou kuličkami. Dynabeads byly promyty 900 µl LWB roztokem jemným pipetováním a

následně inkubovány 5 min při pokojové teplotě v rotátoru. Po inkubaci byla směs přenesena do nové zkumavky a vložena do magnetického stojanu, pomocí kterého byl odstraněn supernatant LWB. Promytí kuliček LWB jemným pipetováním bylo opakováno ještě dvakrát bez následné inkubace. V posledním kroku byly kuličky resuspendovány 250 µl HPH EB a směs se nechala inkubovat 20 min při pokojové teplotě v rotátoru. Směs byla poté vložena do magnetického stojanu a eluát 1 byl přenesen do nové zkumavky, která se následně položila na led. Následovala další eluce vzorku MST1 prostřednictvím HPH EB roztoku. Ke kuličkám bylo přidáno 250 µl HPH EB a nechala se směs inkubovat 10 min při pokojové teplotě v rotátoru. Po inkubaci byla směs ve zkumavce vložena do stojanu a eluát 2 byl přenesen ke 250 µl eluátu 1. Výsledný objem vzorku MST1 proteinu činil 500 µl. Vzorky byly lyofylyzovány ve vakuovém koncentrátoru a odstředivém evaporátoru RC10-10 a následně byly analyzovány prostřednictvím SDS elektroforézy, barvením Coomassie™ Brilliant Blue. Vzorky se použily při hmotnostní spektrometrii.

SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

Podmínky a postup separace proteinů pomocí SDS-PAGe byl analogický s postupem v kapitole 5.4.4. Při elektroforéze vzorků připravených protokolem Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit byl však použit komerčně připravený 4-15% gel Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels.A rozdíl byl i v dalším kroku, přípravě jednotlivých vzorků určených k elektroforéze. Do vzorků bylo přidáno 15 µl RIPA pufru a 5 µl 4x koncentrovaného vzorkového pufru Leammli s 2-merkaptoethanolem. Vzorky byly ohřívány 5 minut při teplotě 70 °C. Po ohřevu a denaturaci proteinů byly vzorky krátce, 6s, centrifugovány přístrojem 5424R, za účelem usazení vzorku na dně zkumavky. Další postup zůstal zachován. Fragment MST1 proteinu na polyakrylamidovém gelu jsme nechali vizualizovat přes noc pomocí roztoku Coomassie™ Brilliant Blue (45% methanol; 10% HAc; 0,25% Commasie briliantová modř; H_2O). Následující den byl gel odbarven roztokem (55% H_20; 35% ethanol; 10% HAc) a detekován prostřednictvím CCD kamery ChemiDoc™ MP Imaging Systém.

5.7. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, při které jsou molekuly vzorku převedeny na ionty a hmotnostní spektrometr měří poměr jejich hmotnosti k náboji a zaznamenává jejich relativní intenzity. Tato metoda se používá pro stanovení hmotnosti částic, elementárního složení vzorku případně molekul a k objasnění chemické struktury. V této studii jsme se zaměřili na posttranslační modifikace MST1 kinasy leukemických buněk.

Po precizním odbarvení gelu byly pásy vzorku MST1 kinasy vyřezány a přeneseny do zkumavky, následně se několikrát promyly s 0,1 M 4-ethylmorfolinacetátem (pH 8,1) v 50% acetonitrilu (AcN). Po úplném odbarvení byl gel promyt deionizovanou vodou, dehydratován v AcN a poté opět rehydratován v deionizované vodě. Následně byl odstraněn supernatant a gel se nechal částečně vysušit ve vakuovém koncentrátoru RC10-10 (JOUAN). Kusy gelu se poté rekonstituovaly štěpícím pufrem (50 mM 4-ethylmorfolinacetát; 10% AcN; 50 ng/ l trypsin). Následovalo celonoční štěpení při 37 °C, ze kterého se jsme získali tryptické peptidy. Tyto peptidy se poté extrahovaly 10% AcN a 1% kyselinou octovou. Extrahované peptidy byly vysušeny ve vakuovém koncentrátoru RC10-10 a separovány v 10 µl 5% AcN.

Při analýze vzorků jsme použili nano reverzní fázové kolony (EASY-Spray kolona; 50 cm x 75µg ID; PepMap C18; 2 µm částice; velkost pórů 100 Å). Analýza peptidů byla provedena hmotnostním spektrometrem Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT; Thermo). Všechny získané údaje byly analyzovány a kvantifikovány pomocí software MaxQuant (verze 1.5.3.8.) a vyhledávacího přístroje Andromeda, jež byl použit k nalezení hmotnostního spektra lidské MST1 kinasy v databázi spekter.

Pozorovali jsme posttranslační modifikace MST1 kinasy se zaměřením zejména na acetylace N terminální domény, fosforylace (S,T) a N-acetylace (S,T).

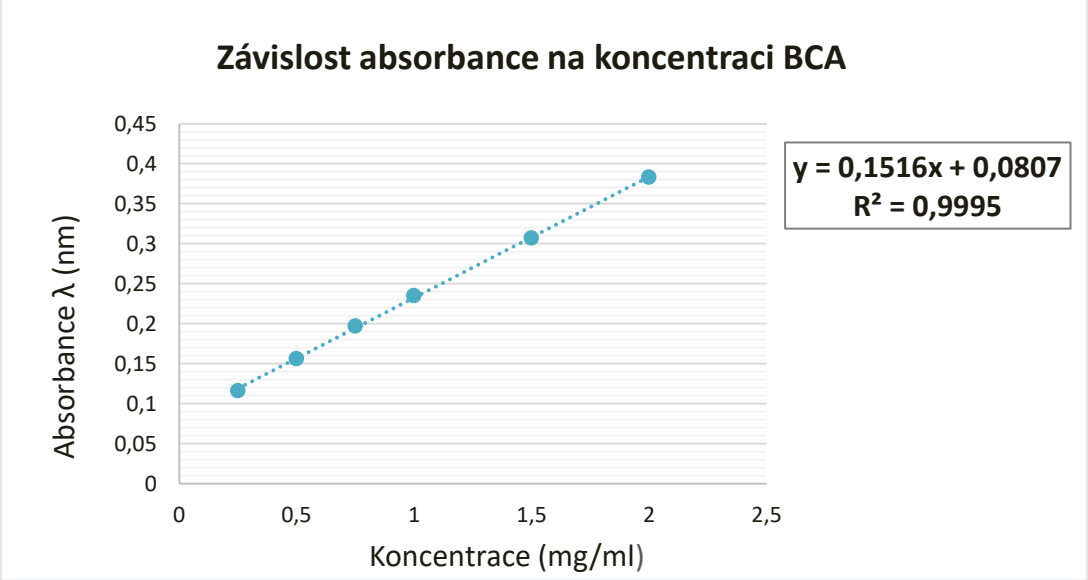
6. Výsledky

V rámci této diplomové práce jsem se snažila popsat vliv Shikoninu na průběh buněčné signalizace v leukemických buňkách. Dále jsem se zaměřila na MST1 kinasu, součást centrálního proteinového komplexu Hippo signální dráhy, který ve svém aktivním stavu sehrává důležitou tumorsupresorovou úlohu, proto by v budoucnu mohl přispět k efektivní léčbě pacientů s leukemií. Dále jsem pomocí hmotnostní spektrometrie sledovala posttranslační modifikace MST1 kinasy.

6.1. Kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů cytosolických frakcí leukemických Jurkat buněk bylo prováděno metodou BCA. Z rovnice regresní lineární kalibrační přímky pro závislost absorbance vzorků BSA standardu na jejich známé koncentraci jsme byli schopni vypočítat koncentraci našich použitých vzorků viz Graf 1. Počet stanovovaných vzorků v této studii byl 12, každý vzorek jsme stanovovali celkem dvakrát, abychom dosáhli co nejpřesnějších výsledků. Naměřené hodnoty absorbancí každého vzorku byly zprůměrovány aritmetickým průměrem a následně z této zprůměrované hodnoty byla vypočítána výsledná koncentrace proteinu. Výsledná koncentrace byla přepočítána a násobena použitou hodnotou ředění (5x). Výsledky jsou popsané v Tabulce 14.

Graf 1. Závislost absorbance od koncentrace.

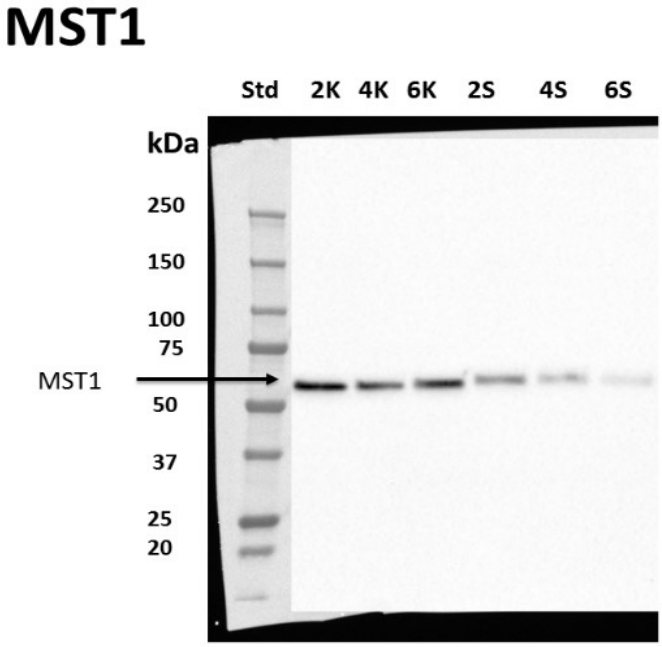


Tabulka 14. Výsledky koncentrace vzorků proteinů.

Vzorek	Absorbance (λ=562 nm)	Koncentrace mg/ml
2 hod Shikonin	0,143	2,1
4 hod Shikonin	0,141	1,9
6 hod Shikonin	0,129	1,6
2 hod Kontrola	0,169	2,9
4 hod Kontrola	0,181	3,3
6 hod Kontrola	0,181	3,3

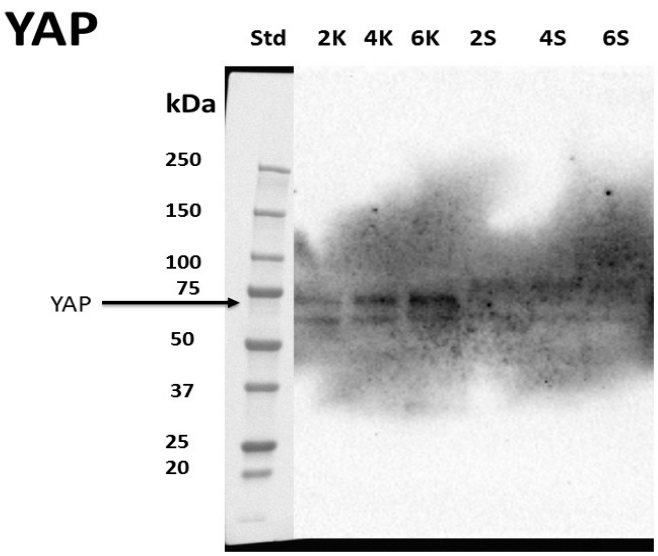
6.2. Výsledky imunodetekce proteinů

Pozorovali jsme vliv přírodní látky shikonin v časovém intervalu na proteiny signálních drah v leukemických buňkách. Shikonin inhibuje glykolysu a respirační řetězec, což se projevuje i na úrovni signálních drah. Vzorky proteinů po přenosu na nitrocelulosovou membránu byly imunologicky detekovány a vizualizovány chemiluminiscenčně. Výsledky poukazují na velmi výrazný vliv shikoninu na jednotlivé signální dráhy v nádorových buňkách. Na Obrázku 9 je vidět, jak shikonin ovlivňuje MST1 kinasu (60 kDa), protein Hippo signální dráhy. Je zřejmé, že shikonin rychle aktivuje MST1 kinasu, která s rostoucím intervalem sklízení ubývá v celkové formě, zatímco v kontrolních vzorkách se výrazně nemění. Bohužel jsme nepozorovali přírůstek 36 kDa fragmentů MST1, což mohlo být způsobeno nedostatečnou afinitou použité protilátky. Shikonin totiž běžně tvorbu fragmentů indukuje [47].



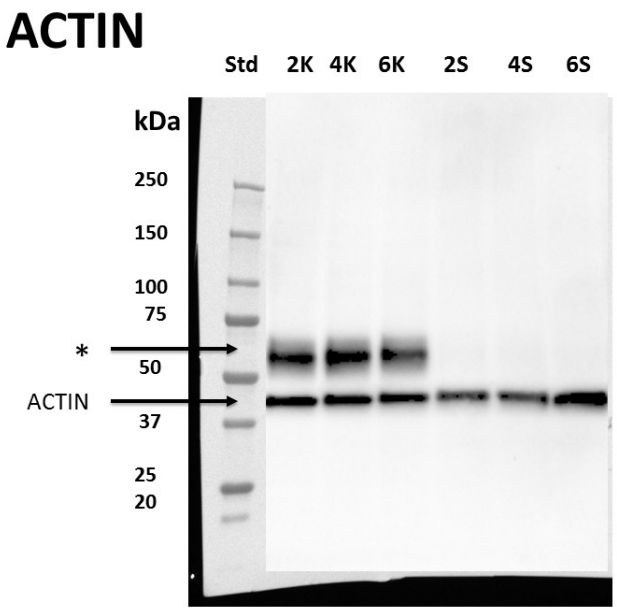
Obrázek 9. Imunodetekce MST1 kinasy. Imunodetekce MST1 kinasy po přidání 2 µM shikoninu zpracovaná v časovém intervalu 2hod, 4hod, 6hod a v jednotlivých kontrolních vzorcích bez přídavku shikoninu. Std.- standard, K- kontrola, S- shikonin, jednotlivé čísla 2, 4, 6 označují dobu sklízení.

Na Obrázku 10 je vidět vliv shikoninu na další protein Hippo signální dráhy, protein YAP (70 kDa). Z chemiluminiscenční detekce pomocí vysoce citlivého substrátu vidíme úbytek YAP v celkové formě s rostoucím časovým intervalem. Úbytek YAP je způsoben především aktivací MST1 proteinu shikoninem. YAP je pravděpodobně fosforylován a následně degradován. Jeho přítomnost v kontrolních vzorcích je viditelná. Dvojité fragmenty jsou způsobené nespecifitou použité protilátky nebo posttranslační modifikací YAP proteinu.



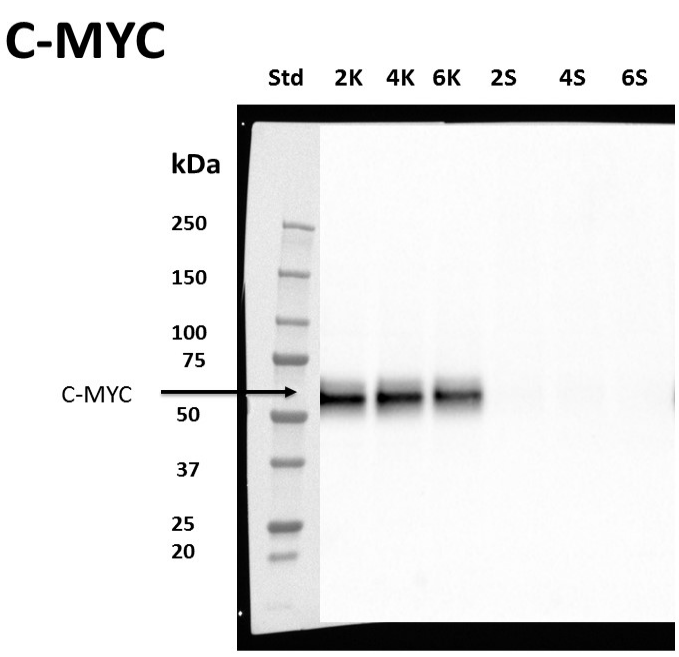
Obrázek 10. Imunodetekce YAP proteinu. Imunodetekce YAP proteinu po přidání 2 µM shikoninu zpracovaná v časovém intervalu 2hod, 4hod, 6hod a v jednotlivých kontrolních vzorkách bez přídavku shikoninu. Std.- standard, K- kontrola, S- shikonin, jednotlivé čísla 2, 4, 6 označují dobu sklízení**.**

Na Obrázku 11 pozorujeme vliv shikoninu na protein ACTIN (40 kDa). ACTIN je cytoskeletární protein, který se konstitutivně exprimuje v buňkách. V tomto případě nám slouží jako kontrola nanášky k předcházející imunodetekci proteinu YAP. Jeho exprese je přibližně stejná ve všech časových intervalech a není viditelný významný úbytek v žádném z pozorovaných vzorků. Exprese ACTINU není ovlivněná shikoninem.



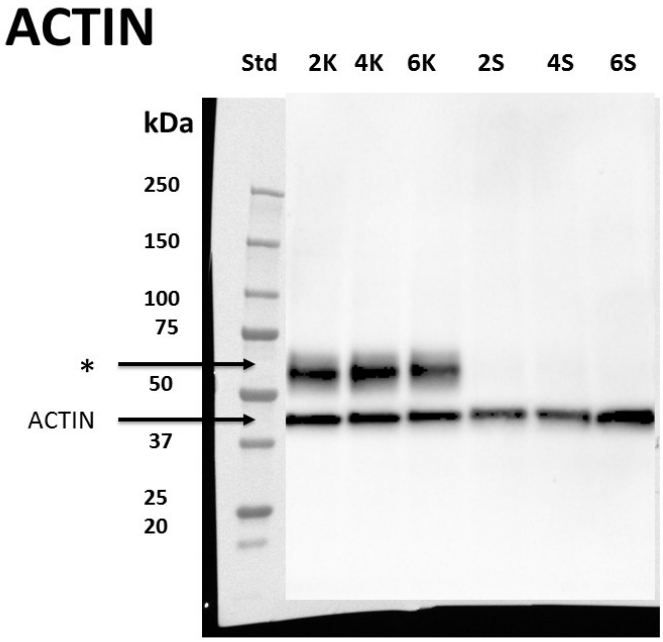
Obrázek 11. Imunodetekce cytoskeletárního proteinu ACTIN. Imunodetekce proteinu ACTIN po přidání 2 µM shikoninu zpracovaná v časovém intervalu 2hod, 4hod, 6hod a v jednotlivých kontrolních vzorkách bez přídavku shikoninu. Std- standard, K-kontrola, S- shikonin, jednotlivé čísla 2, 4, 6 označují dobu sklízení. *- signál z předchozího barvení.

Na Obrázku 12 pozorujeme vliv shikoninu na protein C-MYC (50 kDa). Detekce poukázala na úbytek proteinu v celkové formě ve všech vzorcích ošetřených shikoninem. Celkový úbytek je způsoben pravděpodobně aktivací MST1 kinasy a fosforylací YAP, jenž se stává inaktivní. Shikonin inhibuje expresi proteinu C-MYC prostřednictvím Hippo signální dráhy [47]. Kontrolní vzorky poukazují na jeho výskyt a expresi.



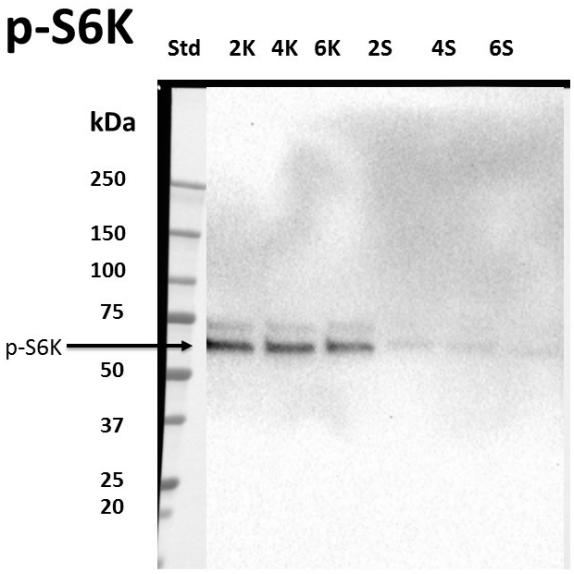
Obrázek 12. Imunodetekce C-MYC proteinu. Imunodetekce C-MYC proteinu po přidání 2 µM shikoninu zpracovaná v časovém intervalu 2hod, 4hod, 6hod a v jednotlivých kontrolních vzorkách bez přídavku shikoninu. Sts-standard, K-kontrola, S- shikonin, jednotlivé čísla 2, 4, 6 označují dobu sklízení.

Na Obrázku 13 můžeme vidět vliv shikoninu na protein ACTIN (40 kDa). ACTIN nám i v tomto případě sloužil jako kontrola nanášky k předcházející imunodetekci proteinu C-MYC. Exprese ACTINU je přibližně stejná ve všech pozorovaných vzorcích a v každém časovém intervalu. Viditelný úbytek proteinu ACTIN není pozorován v žádném vzorku.



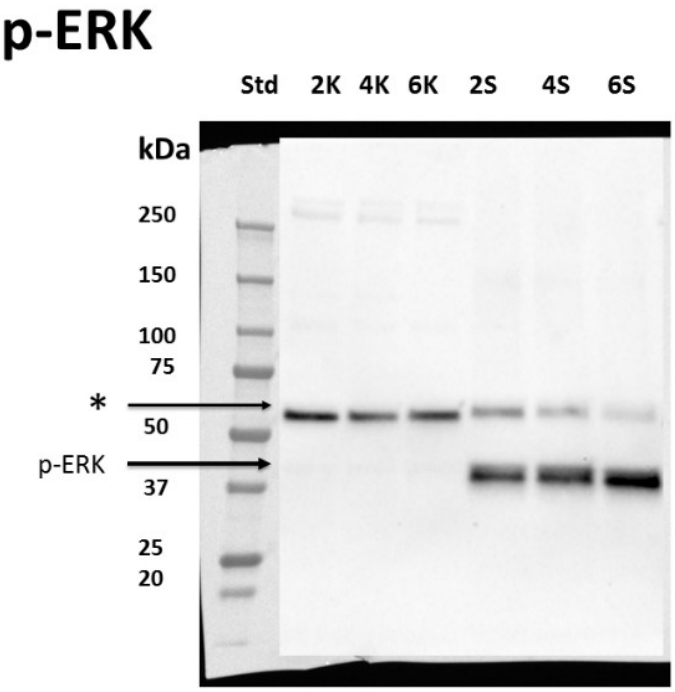
Obrázek 13. Imunodetekce proteinu ACTIN. Imunodetekce proteinu ACTIN po přidání 2 µM shikoninu zpracovaná v časovém intervalu 2hod, 4hod, 6hod a v jednotlivých kontrolních vzorkách bez přídavku shikoninu. Std-standard, K- kontrola, S- shikonin, jednotlivé čísla 2, 4, 6 označují dobu sklízení. *- signál z předchozího barvení.

Obrázek 14 znázorňuje vliv shikoninu na p-S6 kinasu (p-S6K; 60 kDa). Úbytek celkové formy p-S6K působením shikoninu je viditelný ve všech vzorcích a je pravděpodobně způsoben inaktivací mTOR signální dráhy. Dvojitý fragment u kontrolních vzorků je způsoben nespecifitou protilátky nebo posttranslační modifikací p-S6K kinasy.



Obrázek 14. Imunodetekce S6 kinasy. Imunodetekce p-S6 kinasy po přidání 2 μM shikoninu zpracovaná v časovém intervalu 2hod, 4hod, 6hod a v jednotlivých kontrolních vzorkách bez přídavku shikoninu. Std- standard, K-kontrola, S- shikonin, jednotlivé čísla 2, 4, 6 označují dobu sklízení.

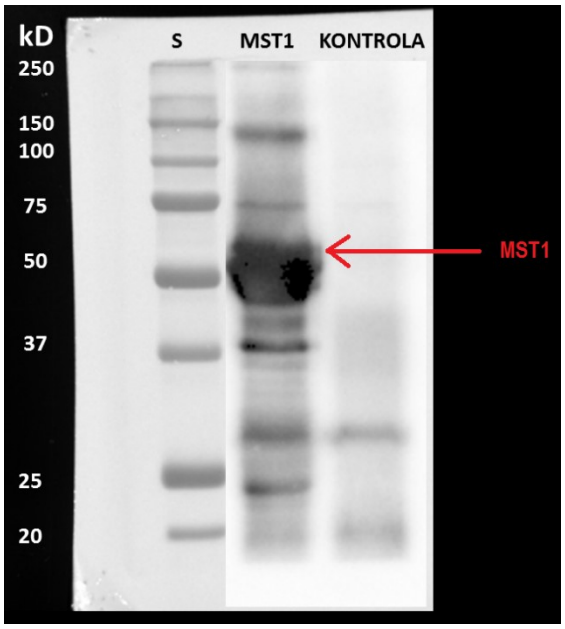
Na Obrázku 15 vidíme vliv přídavku shikoninu na kinasu p-ERK (40 kDa). ERK je součástí RAS/RAF/MEK/ERK signální dráhy, p-ERK je jeho fosforylovaná forma. V kontrolních vzorcích jsou viditelné fragmenty v oblasti 40 kDa, zatímco vzorky s přídavkem shikoninu poukazují na jeho přítomnost. Shikonin zřejmě inhibuje fosfatasy, které jinak p-ERK defosforylují, proto jsme ho v kontrolních vzorcích nebyli schopni detekovat. Vlivem shikoninu dochází k inhibici fosfatas a p-ERK zůstává fosforylován, a proto je detekovatelný pomocí imunodetekce.



Obrázek 15. Imunodetekce kinasy p-ERK. Imunodetekce p-ERK po přidání 2 μM shikoninu zpracovaná v časovém intervalu 2hod, 4hod, 6hod a v jednotlivých kontrolních vzorkách bez přídavku shikoninu. Std- standard, K-kontrola, S- shikonin. Čísla 2, 4, 6 označují dobu sklízení. *- signál z předchozího barvení.

6.3. Výsledky imunoprecipitace MST1 kinasy

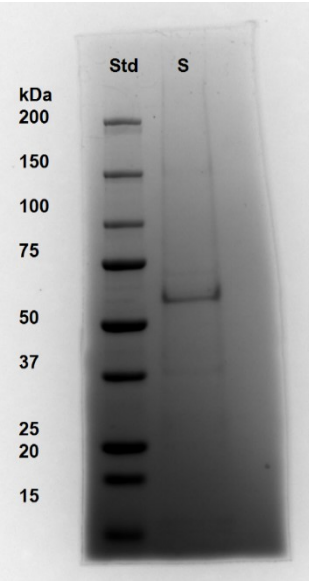
Imunoprecipitace proteinu MST1 přes Protein PLUS G- Agarosu nebyla velmi účinná. Na Obrázku 16, získaného chemiluminiscenční imunodetekcí, můžeme pozorovat při velikosti 60 kDa fragment, který patří MST1 proteinu, ale není dostatečný pro následnou detekci pomocí barvení Coomassie™ Brilliant Blue. Také je možné vidět velký počet nespecifit, ta největší je v oblasti 50 kDa. Jedná se pravděpodobně o těžký řetězec protilátky IgG. Kontrolní vzorky neobsahovaly přidanou protilátku.

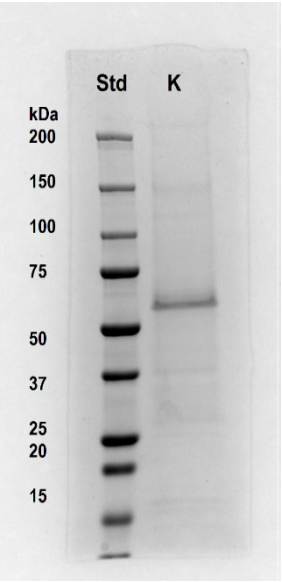


Obrázek 16. Imunodetekce MST1 kinasy. Vzorky získané imunoprecipitací přes Protein PLUS G-Agarosu. V oblasti 60 kDa je viditelný slabý fragment MST1 kinasy. Kontrola představovala vzorek bez přídavku protilátky.

6.4 Výsledky imunoprecipitace přes magnetické kuličky

Kvůli nízké účinnosti metody precipitace MST1 kinasy přes Protein PULS G- Agarosu jsme se rozhodli použít jinou metodu, imunoprecipitaci přes magnetické kuličky s kovalentně navázanou protilátkou proti MST1 proteinu. Tato metoda vykazovala vysokou míru účinnosti, viz Obrázek 17 a Obrázek 18. Obrázek 17 reprezentuje vzorek s přidaným shikoninem, Obrázek 18 reprezentuje kontrolní vzorek bez přídavku shikoninu. Na obou obrázcích pozorujeme na gelech proužek v oblasti 60 kDa, který reprezentuje MST1 kinasu. Oba proužky MST1 byly použity pro analýzu hmotnostní spektrometrií.





Obrázek 17, Gel pro vzorek MST1 se shikoninen. Na obrázku pozorujeme viditelný fragment v oblasti 60 kDa, který patří MST1 kinase. Zkratka Std- standard, S- shikonin.

Obrázek 18. Gel pro kontrolní vzorek MST1 kinasy. Na obrázku pozorujeme viditelný fragment v oblasti 60 kDa, který patří MST1 kinase. Zkratka Std- standard, K- kontrolní vzorek

6.5. Výsledky hmotnostní spektrometrie

Prostřednictvím analýzy hmotnostní spektrometrie jsme získali údaje o modifikacích v sekvenci MST1 kinasy. Pozorovali jsme posttranslační modifikace se zaměřením zejména na acetylace N terminální domény, fosforylace (S,T) a N-acetylace (S,T). Výsledky spektrometrie obsahovaly hlavně fosforylace S a T, viz Tabulka 15. Pokrytí proteinové sekvence v obou vzorcích bylo 78 %.

Sekvence aminokyselin vzorku MST1 kinasy s přídavkem Shikoninu

```
  1 METVQLRNPP RRQLKKLDED SLTKQPEEVF DVLEKLGEGS YGSVYKAIHK
 51 ETGQIVAIKQ VPVESDLQEI IKEISIMQQC DSPHVVKYYG SYFKNTDLWI
101 VMEYCGAGSV SDIIRLRNKT LTEDEIATIL QSTLKGLEYL HFMRKIHRDI
151 KAGNILLNTE GHAKLADFGV AGQLTDTMAK RNTVIGTPFW MAPEVIQEIG
201 YNCVADIWSL GITAIEMAEG KPPYADIHPM RAIFMIPTNP PPTFRKPELW
251 SDNFTDFVKQ CLVKSPEQRA TATQLLQHPF VRSAKGVSIL RDLINEAMDV
301 KLKRQESQQR EVDQDDEENS EEDEMDSGTM VRAVGDEMGT VRVASTMTDG
351 ANTMIEHDDT LPSQLGTMVI NAEDEEEEGT MKRRDETMQP AKPSFLEYFE
401 QKEKENQINS FGKSVPGPLK NSSDWKIPQD GDYEFLKSWT VEDLQKRLLA
451 LDPMMEQEIE EIRQKYQSKR QPILDAIEAK KRRQQNF
```

Sekvence aminokyselin kontrolního vzorku MST1 kinasy bez přídavku Shikoninu

```
  1 METVQLRNPP RRQLKKLDED SLTKQPEEVF DVLEKLGEGS YGSVYKAIHK
 51 ETGQIVAIKQ VPVESDLQEI IKEISIMQQC DSPHVVKYYG SYFKNTDLWI
101 VMEYCGAGSV SDIIRLRNKT LTEDEIATIL QSTLKGLEYL HFMRKIHRDI
151 KAGNILLNTE GHAKLADFGV AGQLTDTMAK RNTVIGTPFW MAPEVIQEIG
201 YNCVADIWSL GITAIEMAEG KPPYADIHPM RAIFMIPTNP PPTFRKPELW
251 SDNFTDFVKQ CLVKSPEQRA TATQLLQHPF VRSAKGVSIL RDLINEAMDV
301 KLKRQESQQR EVDQDDEENS EEDEMDSGTM VRAVGDEMGT VRVASTMTDG
351 ANTMIEHDDT LPSQLGTMVI NAEDEEEEGT MKRRDETMQP AKPSFLEYFE
401 QKEKENQINS FGKSVPGPLK NSSDWKIPQD GDYEFLKSWT VEDLQKRLLA
451 LDPMMEQEIE EIRQKYQSKR QPILDAIEAK KRRQQNF
```

Tabulka 15. Shrnutí fosforylovaných S/T míst MST1 kinasy.

Vzorek MST1 kinasy s přídavkem shikoninu	**Kontrolní vzorek MST1 kinasy**
FOSFORYLACE S43 T177 S320 T340 T380 T387 S410 S414 S422	FOSFORYLACE T177 S320 T340 T380 T387 S410 S422 S438

Z výsledků je patrné, že oba vzorky mají poměrně velký počet stejných fosforylačních míst. Vzorek MST1 s přídavkem shikoninu se lišil fosforylací na S43 a S414. Shikonin indukoval defosforylaci S438 v porovnání s kontrolním vzorkem.

7. Diskuse

Nádorové onemocnění je velmi často doprovázeno deregulací signálních drah, které buňkám poté poskytují určité proliferační výhody. Přírodní látka Shikonin inhibuje glykolysu a respirační řetězec, což se projevuje na úrovni proteinových signálních drah.

Na Obrázku 9 můžeme pozorovat v oblasti 60 kDa fragment MST1 kinasy. Její úbytek v čase ve vzorkách ošetřených shikoninem byl způsoben štěpením během její aktivace. Aktivovaná MST1 kinasa dále fosforyluje proteiny, jež mají proapoptický, ale i antiapoptotický účinek, které jsou fosforylačně inhibovány. Shikonin se projevil jako možná látka indukující apoptosu v nádorových buňkách aktivací Hippo signální dráhy.

Na Obrázku 10 je možné vidět v oblasti 70 kDa YAP protein. Fragmenty jsou viditelné v kontrolních vzorcích. Vzorky ošetřené shikoninem zaznamenaly jeho celkový pokles. Tento úbytek je pravděpodobně způsoben aktivací MST1 kinasy indukované shikoninem, YAP je fosforylován a následně degradován.

Vliv shikoninu na cytoskeletární protein ACTIN je znázorněn na Obrázku 11 a Obrázku 13. V obou případech se fragment ACTINU v oblasti 40 kDa neměnil ani v kontrolním vzorku, ani ve vzorku s přídavkem shikoninu. Fragment byl konstitutivně exprimován a sloužil jako kontrola nanášky pro ostatní imunopřenosy.

Na Obrázku 12 pozorujeme v oblasti přibližně 50 kDa úbytek celkové formy proteinu C-MYC ve vzorku s přídavkem shikoninu. Úbytek je způsoben pravděpodobně aktivací MST1 kinasy a fosforylací YAP, který se stává inaktivní a netranslokuje se do buněčného jádra, kde jinak ovlivňuje expresi proteinu C-MYC. Shikonin inhibuje expresi proteinu C-MYC prostřednictvím Hippo signální dráhy.

Na Obrázku 14 v oblasti 60 kDa pozorujeme ve všech vzorcích ošetřenými shikoninem celkový úbytek fosforylované formy S6 kinasy, která je součástí mTORC2 signální dráhy. shikonin nejspíše inaktivuje mTORC2 signální dráhu, a tak i p-S6 kinasu.

Obrázek 15 charakterizuje vliv shikoninu na protein p-ERK. V oblasti 40 kDa v kontrolním vzorku nepozorujeme žádný signál, zatímco u vzorku se shikoninem je viditelný. Shikonin inhibuje fosfatasy, které jinak p-ERK defosforylují, a proto jsme ho v kontrolním vzorku zřejmě nebyli schopni detekovat. p-ERK u vzorku se shikoninem zůstává fosforylován a schopný imunodetekce.

Obrázek 16 znázorňuje výsledek imunoprecipitace MST1 kinas prostřednictvím Protein PLUS G-Agarosy. Tato imunoprecipitace nebyla velmi účinná, protože množství MST1

proteinu bylo malé a nestačilo pro detekci MST1 barvením Coomassie™ Brilliant Blue. V oblasti 50-60 kDa jsou zřetelné velké nespecifity, které by při další detekci mohly zkreslovat údaje. Pravděpodobně se jednalo o fragment protilátky IgG.

Hmotnostní spektrometrií jsme se snažili identifikovat posttranslační modifikace v průběhu působení shikoninu na leukemické buňky. Výsledky v Tabulce 15 poukazují na velký počet stejných fosforylačních míst v obou vzorcích.

T177 je pravděpodobně autofosforylován a mohl by napomoci v aktivaci MST1 kinasy. V takovém případě je aktivace nejspíše blokována dalšími posttranslačními modifikacemi [101]. T340 je fosforylován CHK1 kinasou a pravděpodobně má inhibiční efekt [102]. T380 je autofosforylován a sehrává důležitou úlohu pro vazbu adaptorového proteinu MOB1 [103]. S320 je fosforylován CHK1 kinásou, tato fosforylace způsobí inhibici aktivity MST1 [104] GSK3 kinasa fosforyluje S410 a NEK6 kinasa fosforyluje S422. Konečný efekt těchto fosforylací je inhibiční [105]. T387 je fosforylován AKT kinasou, tato posttranslační modifikace má také spíše inhibiční efekt [106].

Pouze v kontrolním vzorku bylo možné pozorovat fosforylaci S438. Tato fosforylace je způsobená aktivitou mTORC2 signální dráhy [107]. Shikonin inhibuje mTORC2 signalizaci, což je viditelné i na Obrázku 14, popisující p-S6 kinasu, která je jednou z efektorových kinas mTOR signalizace. Právě tato defosforylace S438 u vzorku ošetřeného shikoninem může představovat možný aktivační mechanismus MST1 kinasy.

Mechanismy způsobující fosforylaci S43 a S414 nejsou známy, přestože tyto modifikace byly již popsány v databázi PhosphoScan. Na základě našich výsledků je možné pouze usuzovat aktivační potenciál těchto modifikací. Může zde být spojitost s ERK signalizací (která se aktivuje shikoninem, viz Obrázek 15), nebo naopak s inhibicí specifických fosfatas (možný mechanismus aktivace ERK kinasy).

8. Závěr

Prostřednictvím série imunopřenosů se nám podařilo potvrdit aktivační vliv přírodní látky shikonin na ERK kinasu a MST1 kinasu a jeho inhibiční vliv na mTOR signální dráhu. Přes imunoprecipitační metody jsme vyizolovali MST1 kinasu a pomocí hmotnostní spektrometrie jsme určili její posttranslační modifikace. Fosforylace S438 kontrolních vzorků je pravděpodobně způsobena mTORC2 signální dráhou. Defosforylace zbytku S438 u vzorků ošetřených shikoninem pravděpodobně předatvuje možný aktivační mechanismus MST1 kinasy.

Seznam použité literatury

[1] Novotvary ČR 2009. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky; 2012; 264. ISBN 9788072809752. www.uzis.cz

[2] VAVRUCH, I., Rakovina a chemické karcinogeny. *Chem.listy*. 1997; 87; s. 504-508.

[3] Nádorová onemocnění. szu.cz [online]. 2007 [cit. 2017-05-16]. Dostupné z: http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni

[4] SAKALOVÁ, A., LIPŠIC, T. a kol., Hematológia a transfuziológia. Martin: Osveta. 1995; s. 85-88. ISBN 8021704446.

[5] VOKURKA, S., Základní hemato-onkologická onemocnění a jejich charakteristiky. Praha: Galén. 2008; s. 7-8, 19. ISBN 9788072625536.

[6] Cancer Stat Facts: Leukemia. Seer.cancer.gov [online]. [cit. 2017-06-24]. Dostupné z: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html

[7] TOMEK, D., BIELIK, J., Inovácie v systémovej liečbe vybraných onkologických ochorení v kontexte farmakoekonomiky. Bratislava: Med - In Alfa. 2007; s. 96. ISBN 9788096965953.

[8] MATÁKOVÁ, T., Vybrané kapitoly z patobiochémie a klinickej biochémie v onkológii. Martin: Osveta; 2016. ISBN 9788081870255.

[9] LODISH, H. a kol., Molecular Cell Biology, , 4th Ed., Media Connected, W.H. Freeman and Company; 2000; s 1113-1123. ISBN 0716731363.

[10] WANG, R. a kol., The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. Immunity; 2011; 35; s.871–882.

[11] DeBERARDINIS, R.J. a kol., Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. Cell.; 2007;104 (49); s.19345–19350.

[12] FERREIRA, L. M. R., Cancer metabolism: The Warburg effect today. Experimental and Molecular Pathology; 2010; 89 (3); s. 372–380.

[13] SLANINOVÁ, V., KREJČÍ, A., Rakovinná buňka a změny jejího metabolismu: cesta k přežití i nástroj k destrukci. Živa; 2013; 5; s. 202-205.

[14] WISE, D. R., THOMPSON, C. B., Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. Trends in biochemical sciences; 2010; 35 (8); s. 427–433.

[15] FLAVIN. R., Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. Future oncol.; 2010; 40 (2); s 323–332.

[16] WONG, N. , OJO,D. a kol., PKM2 contributes to cancer metabolism, Cancer Lett.; 2015; 356; s 184-191.

[17] WONG, N., DeMELO, J. a kol., PKM2 a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism, International journal of cell biology; 2013; 242513.

[18] DAVID, CHEN, C.J. a kol., HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer, Nature; 2010; 463; s 364-368.

[19] MASOPUST, J., a kol., Patobiochemie buňky. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta; 2003; s. 344. ISBN 8023910116.

[20] BERRINDGE, M.J., Cell signalling biology. Press Limited, Portland; 2014.

[21] STEELMAN, L.S. a kol., JAK/STAT, Raf/ MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia; 2004; 18; s. 189–218.

[22] PEYSSONNAUX, C. a kol., Induction of postmitotic neuroretina cell proliferation by distinct Ras downstream signaling pathways. Mol Cell Biol.; 2000; 20; s. 7068–7079.

[23] YAN, J. a kol., Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase, J Biol Chem.; 1998; 273; s. 24052–24056.

[24] FERNANDEZ-MEDARDE, A., SANTOS, E., RAS in cancer and developmental diseases. Genes Cancer; 2011; 2 (3); s. 344–358.

[25] McCUBREY, J.A a kol., Roles of The Raf/Mek/ERK/ Pathway in cell growth, malignat transformation and drug resistance, Biochim Biophys Acta; 2007; 1773 (8); s. 1263-1284.

[26] MEIER, F. a kol., The Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma, Front Biosci.; 2005; 10; s. 2986-3001.

[27] LUO, Z. a kol., Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. Nature; 1996; 383; s.181–185.

[28] FABIAN, D.R. a kol., Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. Mol Cell Biol.; 1993; 13; s. 7170–7179.

[29] DHILLON, A.S. a kol., Regulation of Raf-1 activation and signaling by dephosphosphorylation. EMBO J.; 2002; 21; s. 64–71.

[30] RUSHWORTH, L.K. a kol., Regulation and role of Raf-1.B-Raf heterodimerization, Mol Cell Biol.; 2006; 26; s. 2262–2272.

[31] RANA, S. a kol., Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization, Mol Cell.; 2005; 20; s. 963–969.

[32] DIAZ, B., BARNARD, D. a kol., Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling, Mol Cell Biol.; 1997; 17; s. 4509–4516.

[33] MARRAIS, R. a kol., Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases, J Biol Chem.; 1997; 272; s. 4378–4783.

[34] ALESSI, D.R. a kol., Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1, EMBO J.; 1994; 13; s. 1610–1619.

[35] CHANG, F., McCUBREY, J.A., P21Cip1 induced by Raf is associated with increased Cdk4 activity in hematopoietic cells, Oncogene; 2001; 20; s. 4354–4364.

[36] CHANG, F. a kol., Raf-induced cell cycle progression in human TF1 hematopoietic cells, Cell Cycle; 2002; 1; s. 220–226.

[37] ZHA, J. a kol., Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-XL. Cell; 1996; 87; s. 589–592.

[38] HARADA, H. a kol., Survival factor-induced extracellar signalregulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. Proc Natl Acad Sci USA; 2004; 101; s. 15313–15317.

[39] O'NEILL, E., RUSHWORTH, L. a kol., Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. Science; 2004; 306; s. 2267–2270.

[40] KORNBLAU, S.M., WOMBLE, M. a kol, Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. Blood; 2006; 108(7); s. 2358-2365.

[41] GARNETT, M.J., MARAIS, R., Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. Cancer Cell; 2004; 6; s. 313–319.

[42] PRIOR, I.A., LEWIS, P.D. a kol., A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. Cancer Res.; 2012; 72; s. 2457–2467.

[43] DeBERARDINIS, R.J., LUM, J.J a kol., The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab.; 2008; 7; s.11–20.

[44] SAUCEDO, L.J, EDGAR, B.A, Filling out the Hippo pathway. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.; 2007; 8; s. 613–621.

[45] HARVEY, K.F., ZHANG, D.M. a kol., The Hippo pathway and human cancer. Nat. Rev.Cancer; 2013; 13 (4); s. 246-257.

[46] SCHLEGEMILCH, K. a kol.,Yap1 acts downstream of /-cat-enin to control epidermal proliferation. Cell ; 2011; 144; s. 782–795.

[47] VALIŠ, K. a a kol. SHIKONIN regulates C-MYC and GLUT1 exprression trough MST1-YAP1-TEAD1 axis. Elsevier; 2016; s. 2-8.

[48] SANTINON, G., POCATERRA, A., Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient- Sensing Pathways. Trends in Cell Biology; 2015; s. 1-14.

[49] LIU, C.Y. a kol., PP1 cooperates with ASPP2 to dephos-phorylate and activate TAZ. J. Biol. Chem.; 2011; 286; s. 5558–5566.

[50] WANG, P. a kol., PP1A-mediated dephosphorylation posi-tively regulates YAP2 activity. PLoS ONE; 2011; 6, s. 24288.

[51] WANG, W. a kol., Defining the protein–protein interaction network of the human hippo pathway. Mol. Cell. Proteomics; 2014; 13; s. 119–131.

[52] SACCA, M.M., De MARIA, R., Hippo pathway and breast cancer stem cells. Critical Reviews in Onkology/Hematology; 2016; 99; s. 115-122.

[53] PICCOLO, S. a kol., The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. Physiol. Rev.; 2014; 94; s. 1287–1312.

[54] MOROISHI, T. a kol., The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. Nat. Rev. Cancer; 2015; 15; s. 73–79.

[55] SORRENTINO, G. a kol., Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. Nat. Cell Biol.; 2014; 16; s. 357–366.

[56] MURRAY, R. K. a kol. Harperova ilustrovaná biochemie. 5. české vyd., Praha: Galén; 2012. ISBN 978-80-7262-907-7.

[57] TATIDIS, L. a kol., Decreased feedback regulation of low density lipoprotein receptor activity by sterols in leukemic cells from patients with acute myelogenous leukemia. Journal of lipid research; 1997; 38; s. 2436–2445.

[58] ALIZADEH, J., ZEKI, A.A., Mevalonate Cascade Inhibition by Simvastatin Induces the Intrinsic Apoptosis Pathway via Depletion of Isoprenoids in Tumor Cells. Scientific reports; 2017; 1; s. 1-14.

[59] YU, F.X. a kol., Regulation of the Hippo–YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. Cell; 2012; 150; s.780–791.

[60] HORTON, J.D. a kol., SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.; 2002; 67; s. 491–498.

[61] JEON, T.I., OSBORNE, T.F., SREBPs: metabolic integra-tors in physiology and metabolism. Trends Endocrinol. Metab.; 2012; 23; s. 65–72.

[62] FREED-PASTOR, W.A. a kol., Mutant p53 disrupts mam-mary tissue architecture via the mevalonate pathway. Cell; 2012; 148; s. 244–258.

[63] YEGANEH, B. a kol., Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease. Pharmacol Ther; 2014; 143; s. 87–110.

[64] WANG, T. a kol., Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway. Oncotarget; 2016; 7; s. 2532–2544.

[65] WONG, W. a kol., HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. Leukemia; 2002; 16; s. 508–519.

[66] HAVULA, E., HIETAKANGAS,V., Glucose sensing by ChREBP/MondoA-Mlx transcription factors. Semin. Cell Dev. Biol.; 2012; 23; s. 640–647.

[67] LAPLANTE, M., SABATINI, D.M., mTOR signaling in growth control and disease. Cell; 2012; 149; s. 274–293.

[68] HINDUPUR, S.K. a kol., The opposing actions of target of rapamycin and AMP-activated protein kinase in cell growth con-trol. Cold Spring Harb. Perspect. Biol.; 2015; 7; a019141.

[69] ENZO, E. a kol., Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. EMBO J.; 2015;34; s. 1349–1370.

[70] FENG, W. a kol., Targeting unique metabolic properties of breast tumor initiating cells. Stem Cells; 2014; 32; s. 1734–1745.

[71] CORDENONSI, M. a kol. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. Cell; 2011; 147; s. 759–772.

[72] COELHO, R.G. a kol. Hexokinase and phosphofructokinase activity and intracellular distribution correlate with aggressiveness and invasiveness of human breast carcinoma. Oncotarget; 2015; 6; s. 29375–29387.

[73] CLEM, B. a kol., Small-molecule inhibition of 6-phospho-fructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. Mol. Cancer Ther.; 2008; 7; s. 110–120.

[74] DeRAN, M. a kol., Energy stress regulates hippo–YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiomotin-like 1 protein. Cell Rep.; 2014; 9; s. 495–503.

[75] WANG, W. a kol., AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. Nat. Cell Biol.; 2015; 17; s. 490–499.

[76] MO, J.S. a kol., Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. Nat. Cell Biol.; 2015; 17; s. 500–510.

[77] HENNESEY, B.T. a kol., Exploiting the PI3K/Akt pathway for cancer drug discovery, Nat Rev Drug Discov.; 2005; 4; s. 988-1004.

[78] ENGELMAN, J.A., Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat Rev Cancer.; 2009; 9: s. 550-62.

[79] BELLACOSA, A. a kol., A retroviral oncogene, akt encoding a serine-threonine kinase containing SH-2 like region. Science; 1995; 268; s. 274-277.

[80] YIN, Y., SHEN, W.H., PTEN: a new guardian of the genome. Oncogene; 2008; 18; s. 5443-5453.

[81] LUO, J. a kol., Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. Cancer Cell; 2003; 4 (4); s. 257-262.

[82] PORTA, C. a kol. Targetting PI3K/ Akt/ mTOR signaling in cancer. Frontiers in Oncology; 2014; 4; s. 1-11.

[83] HATOK, J., Významné signálne dráhy a molekuly pri apoptóze. JLF UK, Martin: Osveta; 2016. ISBN 978-80-8187-008-8.

[84] SAXTON, R.A., SABATINI, D.M., mTOR Signaling in Growth, Metabolism and Disease. Cell.; 2017; 168; s. 960-976.

[85] KIM, S.G. a kol., Nutrient regulation of the mTOR complex1 signaling pathway. Mol.Cells; 2013; 35; s. 463–473.

[86] PETERSON, T.R. a kol., mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. Cell ;2011; 146; s. 408–420.

[87] BEN-SAHRA, I. a kol., mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. Science; 2016; 351; s. 728–733.

[88] BEN-SAHRA,I. a kol., Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. Science; 2013; 339; s. 1323–1328.

[89] MEMMONT, R.M, DENNIS, P.A., Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. Cell Signal; 2009; 21; s. 656–64.

[90] ZHAO, B. a kol., Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. GenesDev.; 2011; 25; s. 51–63.

[91] ARTINIAN, N a a kol. Phosphorylation of the Hippo Pathway Component AMOTL2 by the mTORC2 Kinase Promotes YAP Signaling, Resulting in Enhanced Glioblastoma Growth and Invasiveness. The Journal of Biological Chemistry; 2015; 290 (32); s. 19387–19401.

[92] GARZIA-MARTINEZ, J.M., ALESSI, D.R., mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). Biochem. J.; 2008; 416; s. 375–385.

[93] CHOO, A.Y. a kol., Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 2008; 105; s. 17414–17419.

[94] FELDMAN, M.E. a kol., Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. PLoS Biol.; 2009; 7; e38.

[95] THOREEN, C.C. a kol., An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. J. Biol. Chem.; 2009 284; s.8023–8032.

[96] PALM, W. a kol., The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed by mTORC1. Cell; 2015; 162; s. 259–270.

[97] RANGWALA, R. a kol., Combined mTOR and autophagy inhibition: Phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma. Autophagy; 2014; 10; s. 1391–1402.

[98] RODRIK-OUTMEZGUINE, V.S. a kol., mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. Cancer Discov.; 2011; 1; s. 248–259.

[99] RODRIK-OUTMEZGUINE, V.S a kol., Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. Nature; 2016; 534; s. 272–276.

[100] ZHANG, X a kol., The essential role of YAP O-GlcNAcylation in high-glucose-stimulated liver tumorigenesis. NATURE COMMUNICATIONS; 2017, s. 1-15. DOI: 10.1038.

[101] GLANSTING, H. a kol., Mapping of MST1 Kinase Sites of Phosphorylation. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY; 2002; 277(45); s. 42987- 42996.

[102] BLASIUS, M. a a kol. A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. Genome Biology; 2011; s. 1-14.

[103] COUZENS, A.L. a kol., MOB1 Mediated Phospho-recognition in the Core Mammalian Hippo Pathway. Molecular & Cellular Proteomics; 2017; s. 1098- 1110.

[104] SERVAS, CH. a kol. The mammalian STE20-like kinase 1 (MST1) is a substrate for the apoptosis inhibiting protein kinase CK2. Cellular Signalling; 2017; (36); s. 163-175.

[105] DULLA, K. a kol., Quantitative Site-specific Phosphorylation Dynamics of Human Protein Kinases during Mitotic Progression. Molecular & Cellular Proteomics; 2010; s. 1167- 1181.

[106] YANG, S. W. a kol. Akt Phosphorylates Mst1 and Prevents Its Proteolytic Activation, Blocking FOXO3 Phosphorylation and Nuclear Translocation. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY; 2007; 282 (42); s. 30836-30844.

[107] SCIARRETTA, S. a kol. MTORC2 Regulates Cardiac Response to Stress by Inhibiting MST1. Cell Reports; 2015; 11; s. 125- 136.

[URL1] migration.files.wordpress.com/2007/01/albini-and-sporn.jpg; 15.05.2017

"Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů."

Jméno, příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka