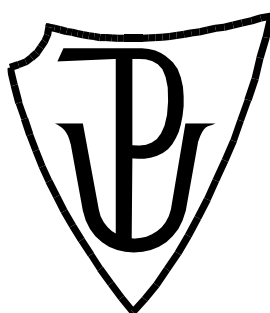


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Cytotoxické účinky geldanamycinu a jeho derivátu u buněk multiformního glioblastomu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Hana Hrachovcová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Petru Mlejnкови, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, připomínky a konzultace během vypracování diplomové práce. Upřímné díky patří všem spolupracovníkům Ústavu normální anatomie na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Za vytvoření přátelské atmosféry a ochotnou spolupráci děkuji RNDr. Petru Doleželovi, Mgr. Nikole Pastvové, Mgr. Elišce Lakomé a Mgr. Jakubovi Havláskovi. Diplomová práce byla vypracována za podpory grantu IGA LF 2018 008.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Hana Hrachovcová
Název práce	Cytotoxické účinky geldanamycinu a jeho derivátu u buněk multiformního glioblastomu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Univerzita Palackého, LF, Ústav normální anatomie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Multiformní glioblastom (GBM) patří mezi nejzávažnější primární maligní mozkové nádory. Současnou léčbu GBM tvoří radikální chirurgická resekce, radioterapie s chemoterapií (temozolomid, TMZ). Hlavním problémem léčby nádoru GBM je heterogenita nádoru a snížený transport léčiv přes hematoencefalickou bariéru. V současné době neexistuje vhodná alternativa k TMZ, která by výrazným způsobem zlepšila léčbu, proto se stále hledají nové alternativní postupy.

V této práci byly vybrány inhibitory Heat shock protein 90 (HSP90), protože nádorové buňky jsou na nich ve zvýšené míře závislé. Byl studován vliv inhibitorů HSP90 geldanamycinu (GDN) a tanespimycinu (17-AAG) na třech glioblastomových buněčných liniích s různým genetickým pozadím. Bylo zjištěno, že cytotoxický účinek a transport GDN a 17-AAG závisí na expresi P-glykoproteinu (P-gp). U buněčné linie H4 byla zjištěna zvýšená exprese P-gp. GDN a 17-AAG inhibuje proliferaci a viabilitu u buněk glioblastomu v nanomolárních koncentracích. Analýzou transmembránového mitochondriálního potenciálu bylo zjištěno, že oba inhibitory indukují buněčnou smrt. Podle morfologie jader bylo prokázáno, že typem buněčné smrti je apoptosa. Cytotoxicita TMZ byla srovnána s inhibitory HSP90. TMZ měl nízký cytotoxický účinek.

Klíčová slova	ABC transportéry, Heat shock proteins 90, hematoencefalická bariéra, multiformní glioblastom
Počet stran	90
Počet příloh	6
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Bc. Hana Hrachovcová
surname

Title Cytotoxic effects of geldanamycin and its derivatives
in glioblastoma multiforme cells

Type of thesis Diploma

Department Palacky University, Faculty of Medicine, Institute
of Normal Anatomy

Supervisor doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.

The year of presentation 2019

Abstract

Glioblastome multiforme (GBM) is one of the most serious malignant brain cancer. Current treatment of GBM consists of radical surgical resection, radiotherapy with chemotherapy (temozolomide, TMZ.) The main problem of GBM cancer treatment is cancer heterogeneity and decreased drug transport through blood-brain barrier. Suitable alternative to TMZ, which would significantly improve treatment, currently does not exist. Currently, new alternative procedures are searched.

Heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors have been selected in this thesis due to their cancer cell dependence. The effect of HSP90 geldanamycin (GDN) inhibitors and tanespimycin (17-AAG) inhibitors was studied on three glioblastoma cell lines with different genetic background. The cytotoxic effect and GDN transport and 17-AAG were found to be depended on P-glycoprotein (P-gp) expression. Increased P-gp expression was found in H4 cell line. GDN and 17-AAG inhibit proliferation and viability in glioblastoma cells in nanomolar concentrations. After transmembrane mitochondrial potential analysis was found that both inhibitors induce cell death. Apoptosis was shown to be a type of a cell death based on nucleus morphology. Cytotoxicity of TMZ was compared with HSP90 inhibitors. TMZ had a low cytotoxic effect.

Keywords ABC transporters, Heat shock proteins 90, blood-brain
barrier, glioblastoma multiforme

Number of pages 90

Number of appendices 6

Language Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Nádorová buňka	2
2.1.1	Benigní nádorová tkáň	2
2.1.2	Maligní nádorová tkáň	2
2.1.3	Histogeneze benigního a maligního nádoru.....	2
2.2	Vlastnosti nádorové buňky.....	3
2.2.1	Soběstačnost při tvorbě růstových signálů.....	4
2.2.2	Ztráta citlivosti k signálům inhibující proliferaci buněk.....	7
2.2.3	Neomezený replikační potenciál	7
2.2.4	Angiogeneze	7
2.2.5	Invazivita a schopnost metastázovat	8
2.2.6	Rezistence vůči signálům buněčné smrti	10
2.3	Další vlastnosti nádorové buňky	11
2.3.1	Reprogramování energetického metabolismu.....	11
2.3.2	Podpurná zánětlivá infiltrace	12
2.3.3	Vyhnutí se imunitním mechanismům	13
2.3.4	Nestabilita genomu a mutace	13
2.3.4.1	Protein p53	14
2.3.4.2	Retinoblastomový protein	15
2.3.5	Heat shock protein	15
2.3.5.1	Inhibitory Heat shock proteinu.....	17
2.3.5.2	Geldanamycin	17
2.3.5.3	Tanespimycin	19
2.3.6	Léková rezistence.....	20
2.3.7	ABC transportéry	21
2.3.7.1	ABCB podrodina.....	22
2.3.7.2	ABCC podrodina.....	23
2.3.7.3	ABCG podrodina	24
2.4	Multiformní glioblastom	24
2.4.1	Epidemiologie a etiologie	25
2.4.2	Hematoencefalická bariéra.....	25
2.4.3	Diagnostika	28
2.4.4	Standardní léčba.....	28
2.4.4.1	Temozolomid	29
2.4.4.2	Lomeguatrib.....	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	Materiál	31
3.1.1	Buněčné linie	31
3.1.2	Přístrojové zařízení a použité softwary	31
3.1.3	Použité chemikálie a roztoky	32
3.2	Metody	35
3.2.1	Určení počtu živých a mrtvých buněk	35
3.2.2	Analýza exprese P-glykoproteinu	35
3.2.3	Analýza funkce P-glykoproteinu.....	35
3.2.4	Stanovení intracelulární hladiny geldanamycinu a tanespimycinu	35
3.2.5	Stanovení buněčné proliferace a viability	36
3.2.6	Buněčná extrakce	36
3.2.6.1	Stanovení koncentrace proteinů	36
3.2.6.2	Příprava vzorků, SDS-PAGE, western blott a detekce	37
3.2.7	Stanovení živých buněk pomocí transmembránového mitochondriálního potenciálu.....	37
3.2.8	Analýza buněčného cyklu	38
3.2.9	Stanovení apoptotických buněk	38

4	VÝSLEDKY	39
4.1	Účinnost léčby glioblastomu.....	39
4.2	Účinnost vzhledem k expresi <i>ABCB1</i>	40
4.2.1	Charakteristika rezistentních buněk	40
4.2.1.1	Analýza exprese P-glykoproteinu	40
4.2.1.2	Stanovení funkce P-glykoproteinu.....	41
4.2.1.3	Intracelulární hladina geldanamycinu a tanespimycinu u rezistentních buněk	42
4.2.1.4	Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na citlivost rezistentních buněčných linií	44
4.3	Charakteristika nádorových buněk multifonního glioblastomu.....	44
4.4	Charakteristika buněčné linie H4	45
4.4.1	Analýza exprese P-glykoproteinu	45
4.4.2	Stanovení funkce P-glykoproteinu.....	46
4.5	Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na proliferaci a viabilitu u buněk glioblastomu	47
4.6	Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na analýzu transmembránového potenciálu u buněk glioblastomu.....	48
4.7	Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na buněčný cyklus a indukci apoptosy u buněk glioblastomu.....	52
4.8	Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na morfologii jader u buněk glioblastomu..	70
5	DISKUSE	72
6	ZÁVĚR	75
7	LITERATURA	76
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	88
9	PŘÍLOHY	

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracovat literární rešerši na téma vlastnosti nádorové buňky.
- Popsat charakteristiku inhibitorů Heat shock protein 90 (HSP90) geldanamycinu (GDN) a tanespimycinu (17-AAG).
- Provést literární rešerši na téma mechanismy vzniku lékové rezistence.
- Popsat multifonní glioblastom (GBM) a jeho léčbu.

Experimentální část:

- Studovat interakce inhibitorů HSP90 GDN a 17-AAG s P-glykoproteinem.
- Stručně charakterizovat glioblastomové linie.
- Studovat vliv GDN, 17-AAG na proliferaci a viabilitu u glioblastomových buněčných linií.
- Porovnat cytotoxické vlastnosti inhibitorů HSP90 s temozolomidem.

1 ÚVOD

Nádorové onemocnění je způsobeno změnou v regulačních procesech. Hlavní příčinou vzniku nádoru jsou mutace na úrovni DNA, které regulují buněčnou proliferaci, apoptosu, adhezi buněk a další. Nádory se liší různým fenotypem i genotypem. Nádorová onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí lidí ve vyspělých zemích. Nádory můžeme dělit podle tkáňového původu na karcinomy (z epiteliálních buněk), sarkomy (z pojivových tkání), leukémie a lymfomy (z hematopoetických buněk a buněk imunitního systému), germinální nádory (zárodečné buňky), gliomy a blastomy (nádory nervové soustavy). Mezi nádory centrální nervové soustavy (CNS) patří multiformní glioblastom (GBM) (Mačák *et al.*, 2012).

GBM se řadí k nejzávažnějším nádorům a tvoří pouze 1 % diagnostikovaných nádorů (Gladson *et al.*, 2010). V současné době kombinovou léčbu GBM tvoří chirurgická resekce, po níž následuje léčba radiační terapií s chemoterapií. TMZ je hlavním používaným chemoterapeutikem, nicméně jeho účinnost není velká. Neléčení pacienti umírají do tří měsíců, léčený pacient má medián přežití jeden rok (Krex *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2011). GBM je obtížně léčitelný z důvodu heterogenity nádorů a hematoencefalické bariéry (HEB). HEB omezuje vstup chemoterapeutik do mozku. Bariéra GBM obsahuje ABC transportéry (ABCB1, ABCC1 a ABCG2), které vedou ke vzniku lékové rezistence (Parkin, 2001). GBM obsahuje různé typy mutací, např. mutaci genu *EGFR*. K léčbě se využívá inhibitor tyrosinkinasy (např. erlotinib, gefitinib, imatinib). Ani cílená terapie nevede k výraznému zlepšení léčby, proto se stále hledají další alternativní postupy (Peereboom *et al.*, 2010).

V diplomové práci jsme se zaměřili na inhibitory Heat shock protein 90 (HSP90). Protinádorový účinek je založen na rozdílné citlivosti inhibice HSP90, kdy nádorové buňky mají vyšší citlivost než normální buňky. Inhibitory HSP90 způsobují sníženou buněčnou proliferaci, dochází k akumulaci buněk ve fázi G₂/M, což následně způsobí apoptosu (Sharp a Workman, 2006). Mezi inhibitory HSP90 patří geldanamycin (GDN) a tanespimycin (17-AAG). GDN je pouze modelová látka, kvůli cytotoxicitě se nepoužívá v klinické praxi. Proto byla nasyntetizována řada derivátů GDN s lepšími farmakologickými vlastnostmi. Do klinického testování se dostala látka 17-AAG (Adams a Elliot, 2000; Sydor *et al.*, 2006). V této práci jsme studovali vliv inhibitorů HSP90 na buňky GBM.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Nádorová buňka

Nádorová buňka je buněčný novotvar, který ztratil kontrolu v regulačních procesech. Příčinou jsou mutace DNA, které vedou ke zvýšené buněčné proliferaci a ke vzniku nádorové tkáně. Nádorová buňka je tedy genotypově a fenotypově odlišná od ostatních buněk lidského těla. V buňce se nahromadí několik mutací např. jednobodové mutace, které mohou vést k transformaci buňky. Ke vzniku nádorové buňky dochází k aktivaci několika onkogenů a inaktivaci supresorových genů. Tyto buňky také mají neomezený replikační potenciál, čímž se reaktivuje telomerasa. Vznik mutací je vyvolán působením faktorů z vnitřního i vnějšího prostředí. Jedním z úkolů imunitního systému je likvidace poškozených či abnormálních buněk. Selháním imunitního systému následkem genetických poruch, dochází k nekontrolovatelnému množení nádorových buněk (Renan, 1993; de Visser *et al.*, 2006).

2.1.1 Benigní nádorová tkáň

Nezhoubný (benigní) nádor bývá ostře ohraničen od okolní tkáně, a proto lze většinu snadno chirurgicky odstranit. Na rozdíl od maligního typu se nešíří do okolí a zůstává v místě vzniku. Jedná se o neinvazivní nádor, tudíž prognóza bývá obvykle příznivá. Tento nezhoubný útvar může být závažný, pokud tlačí na primární nervy, hlavní tepnu, či na mozek.

2.1.2 Maligní nádorová tkáň

Zhoubný (maligní) nádor je oproti nezhoubnému typu agresivnější a invazivnější. Tento typ nádoru má schopnost se šířit do různých částí těla (metastázy) a napadat okolní tkáň. Do okolních tkání proniká prostřednictvím krevních a lymfatických cest, kde pak vytváří sekundární nádory.

2.1.3 Histogeneze benigního a maligního nádoru

Na základě histologického původu rozlišujeme nádory podle původní lokalizace nádorové tkáně (Tab. 1).

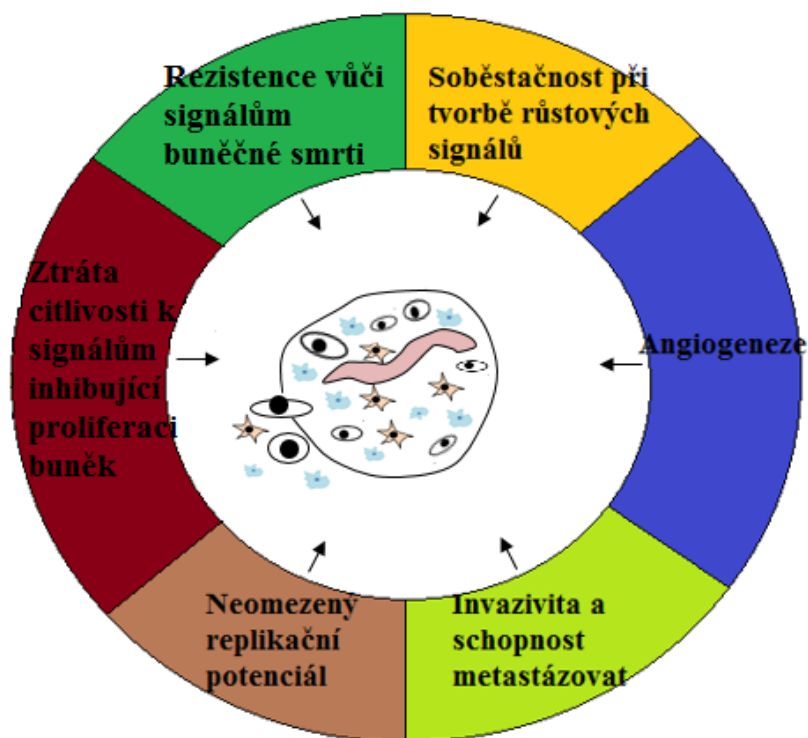
Tab. 1 Základní rozdělení nádorů podle histogeneze (upraveno podle Mačák *et al.*, 2012).

Dělení nádorů podle tkáňového původu	Postižené tkáně	Kritéria dělení	
		Benigní	Maligní
epitelové	povrchový a žláznový epitel	papilom, adenom	karcinom, adenokarcinom
mezenchymové	tuková a pojivová tkáň, cévy, svalovina, chrupavka, kosti, krevní buňky, hematopoetická tkáň	fibrom, lipom, chondrom, osteom, angiom, myom, myofibroblastom, rabdomyom	leukémie, lymfomy, myelom, fibrosarkom, liposarkom, chondrosarkom, osteosarkom, myosarkom, angiosarkom,
neuroektodermové	mozek, centrální nervová soustava (CNS), mícha	gliom, oligodendrogliom, astrocytom, ganglioneurom, paragangliom, meningiom, schwannom, ependrogliom	glioblastom, neuroblastom, melanom, meduloblastom
germinální	zárodečné buňky (vaječníku a varlete)	gonadoblastom, teratom zralý	saminom dysgerminom, teratom nezralý

2.2 Vlastnosti nádorové buňky

Od konce minulého století dochází k rychlému pokroku ve výzkumu nádorových onemocnění. Byly odhaleny charakteristické znaky, které vedou ke vzniku nádoru. Nádorové onemocnění je genetické, souvisí s mutacemi DNA. Mutace způsobují buď aktivaci protoonkogenů na onkogeny, a nebo inaktivaci nádorových supresorů. Díky pokrokům v oblasti molekulární biologie, biochemie a genetiky byly odhaleny charakteristické vlastnosti nádorů. Důkazy naznačují, že tumorigeneze u lidí je vícestupňový proces, při kterém dochází k progresivní přeměně normálních buněk z benigního stavu k maligním nádorům (Renan, 1993).

Hanahan a Weinberg v roce 2000 popsali šest charakteristických vlastností nádorů, které poskytly pochopení neoplastických onemocnění. Patří mezi ně soběstačnost při tvorbě růstových signálů, ztráta citlivosti k signálům inhibující proliferaci buněk, neomezený replikační potenciál, rezistence vůči signálům buněčné smrti, angiogeneze, invazivita a schopnost metastázovat (Obr. 1). Všechny tyto znaky jsou základem nestability genomu. Poslední desetiletí přineslo další charakteristické znaky, jako je přeprogramování metabolismu buňky a únik nádorové buňky imunitnímu systému. Rozšíření poznatků o nádorových onemocnění dává možnost vzniku nových léčiv pro léčbu nádorů (Hanahan a Weinberg, 2011).



Obr. 1 Šest základních vlastností maligního nádorů (upraveno podle Hanahan a Weinberg, 2000).

2.2.1 Soběstačnost při tvorbě růstových signálů

Normální buňka vyžaduje pro růst a dělení mitogenní růstové signály. Nádorová buňka si dokáže vytvářet množství vlastních růstových faktorů. Signální molekuly (růstové faktory, cytokiny, hormony, mitogeny a další) se na povrchu buňky vážou na receptory a spouští signální kaskádu. Jedná se o receptory spřažené s iontovým kanálem, G proteinem nebo obsahující kinasovou doménu. Signál se uvnitř buňky přenáší, amplifikuje a může aktivovat další signální dráhy, které např. regulují průběh buněčného cyklu. Tyrosinkinasové receptory (RTK) [EC 2.7.10.1] bývají v různých typech nádorů nadměrně exprimovány např. receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), jenž bývá exprimován v nádorech žaludku a prsu (Fedi *et al.*, 1997).

Díky výkonným sekvenčním analýzám DNA byly u pacientů s nádory odhaleny různé somatické mutace. U nádoru tlustého střeva bylo zjištěno, že polovina případů obsahuje mutantní onkogen Rat sarkoma (RAS) [EC 3.6.5.2] (Kinzler a Vogelstein, 1996). Nádory (např. kolorektální karcinom, karcinom prsu a plic) mají často mutaci v *EGFR*, což následně vede k aktivaci různých signálních molekul, které pak aktivují signální dráhy např. fosfatidylinositol (3,4,5) trisfosfát kiny (PI3K) [EC 2.7.1.153],

Akt [EC 2.7.11.11] nebo mammalian target of rapamycin (mTOR) [EC 2.7.11.1] (Obr. 2) (Li *et al.*, 2016).

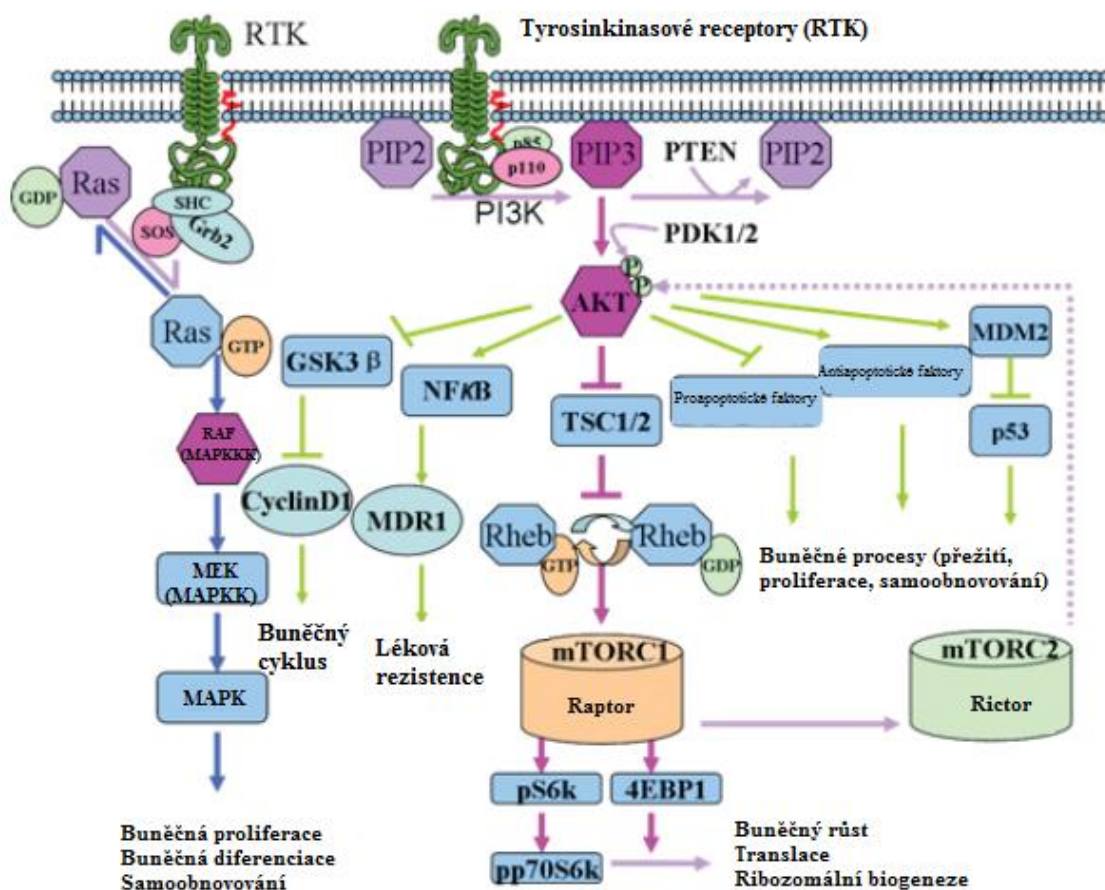
Navázáním signálních molekul dojde k aktivaci PI3K, která fosforyluje fosfatidylinositol-(4,5)-difosfát (PIP2) na fosfatidylinositol-(3,4,5)-trifosfát (PIP3). Negativním regulátorem PI3K dráhy je fosfatasa a tensin homolog (*PTEN*) [EC 3.1.3.48]. *PTEN* byl poprvé objeven v roce 1997 na chromosomu 10 (Li *et al.*, 1997). Jde o nádorový supresorový gen, který kóduje lipidové fosfatasy a defosforyluje PIP3. Mutace *PTEN* způsobuje zesílení signalizace PI3K a podporuje tumorigenezi. Exprese *PTEN* může být snížena např. methylací promotoru. Mutace *PTEN* genu je spojována s nádory prostaty, kůže a prsu (Yuan a Cantley, 2008; Jiang a Liu, 2009).

Signální dráhu proteinové kinasy mTOR tvoří dva komplexy mTORC1 (citlivý k rapamycinu) a mTORC2 (není citlivý k rapamycinu). mTOR ovlivňuje buněčnou proliferaci a metabolismus. Je aktivován kinasou Akt ze signální dráhy PI3K (O'Reilly *et al.*, 2006; Sudarsanam a Johnson, 2010).

Dalším typem signální dráhy je mitogenem aktivovaná protein kinasa (MAPK), která stimuluje buněčnou proliferaci, buněčnou diferenciaci a samoobnovování buněk. Aktivace je zahájena navázáním signální molekuly, což způsobí dimerizaci a autofosforylaci receptoru. Po autofosforylaci se naváže protein growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), Src homology 2 (SH2) skupina a protein Son of Sevenless (SOS) společně na receptor. Po vytvoření komplexu SOS/GRB2 se aktivuje protein RAS výměnou kofaktoru guanosindifosfátu (GDP) za guanosintrifosfát (GTP). RAS aktivuje proteinkinasy RAF [EC 2.7.11.25] a spouští signální dráhu MAPK [EC 2.7.11.24]. U dráhy MAPK jsou známy tři proteinkinasy MAPK3 (RAF) [EC 2.7.11.25], MAPK2 (MEK) [EC 2.7.12.2] a MAPK.

Zvýšená exprese RAF v dnešní době tvoří až 40 % lidských melanomů (Davies a Samuels, 2010).

Aktivace PI3K a Akt dráhy vede k expresi transkripčního faktoru nuclear factor-kappaB (NFκB). NFκB způsobuje buněčnou proliferaci, angiogenezi, metastazování, zánět. Způsobuje také snižování exprese proapoptotických genů a zvyšování exprese ATP binding cassette transporters (ABC transportérů). ABC transportéry jsou jedním z mechanismů vedoucí ke vzniku mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance; MDR). Dráha mTOR se také podílí na vzniku MDR. Množství inhibitorů zaměřených na *EGFR* a PI3K, Akt, mTOR dráhy se využívají v preklinických studiích jako samostatné léky nebo jsou součástí léčby (Sami a Karsy, 2013).



Obr. 2 Mechanismus aktivace dráhy PI3K/Akt/mTOR a funkce v buněčných procesech. Fosfatidylinositol-(3,4,5)-trisfosfát kinasa (PI3K) je aktivována pomocí tyrosinkinase receptorů (RTK) po navázání růstových faktorů např. epidermální růstový faktor. RTK je aktivován a následně dochází k řadě kaskádových reakcí. Po spojení regulační podjednotky p85 a uvolnění katalytické podjednotky p110 dochází k fosforylaci fosfatidylinositol-(4,5)-difosfátu (PIP2) na fosfatidylinositol-(3,4,5)-trifosfátu (PIP3) a naváže se protein fosfatidylinositol-dependentní kinasa 1 (PDK-1). Důležitou roli v mechanismu má fosfatasa a homolog tensinu (*PTEN*), který defosforyluje PIP3 na PIP2. PDK-1 fosforyluje a následně aktivuje Akt, která fosforyluje další molekuly, které mají důležitou funkci v buněčných procesech (proliferace, diferenciace či regulace proapoptotických a antiapoptotických faktorů). Dochází k aktivaci mouse double minute 2 homologu (MDM2), který negativně reguluje nádorový supresorový protein (p53). Dále aktivuje transkripční faktor nuclear factor-kappaB (NFκB), mutace nádorových supresorových genů (*TSC1/2*) a glykogen kinasovou syntesu 3 β (*GSK3β*). Mammalian target of rapamycin (mTOR) je aktivován pomocí proteinu RAS homolog enriched in brain (RHEB). mTORC1 obsahuje regulační protein raptor, dochází k fosforylaci klíčových proteinů pS6k (ribosomální pp70S6k kinasy) a translation initiation factor 4E binding protein 1 (4EBP1). Komplex mTORC2 obsahuje specifickou regulační podjednotku rictor. MAPK kaskáda je aktivována vazbou mitogenu na receptor. RTK změní konformaci a naváže se na něj protein growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), který následně reaguje s proteinem Son of Sevenless (SOS) a aktivuje protein RAS (dochází k výměně kofaktoru guanosindifosfátu (GDP) za guanosintrifosfátu (GTP)). Protein RAS spouští MAPK kaskádu (RAF, MEK a MAPK), aktivuje transkripční faktory, které vedou k proliferaci a diferenciaci buněk (upraveno podle Li *et al.*, 2016).

2.2.2 Ztráta citlivosti k signálům inhibující proliferaci buněk

Základní charakteristikou všech nádorů je nekontrolovatelný růst. Mitogeny se vážou na transmembránové receptory a aktivují signální dráhy propojené s buněčným cyklem. V G₁ fázi buňky reagují na signály a rozhodují se, zda zůstanou v klidové fázi G₀ nebo budou-li proliferovat. Aby si nádorové buňky zachovaly proliferativní aktivitu musí se vyhnout antiproliferačním signálům. Inhibice buněčné proliferace závisí na nádorových supresorových genech. K nejvýznamnějším nádorovým supresorům patří nádorový supresorový protein (p53), retinoblastomový protein (pRb), *PTEN* a *TSC1/2* (Hanahan a Weinberg, 2000; Sherr a McCormick, 2002; Deshpande *et al.*, 2005; Burkhardt a Sage, 2008).

2.2.3 Neomezený replikační potenciál

Normální typy lidských buněk mají konečný počet cyklů buněčného dělení. U somatických buněk se telomerasa [EC 2.7.7.49] téměř nevyskytuje, zatímco u nádorových buněk je aktivní a umožňuje získání neomezeného počtu replikací. Některé kmenové buňky musí být doplňovány po celý život (kostní či kožní), proto mají úplnou telomerasovou aktivitu. Telomerasa zabraňuje zkracování DNA při jednotlivých replikacích a syntetizuje konec DNA.

Telomera je koncová oblast, jejíž struktura zajišťuje dokončení replikace lineárního chromosomu. U člověka jsou typické telomerové repetice. Po výrazném zkrácení telomer, buňka vyhodnotí DNA jako poškozenou, aktivuje p53 a způsobí apoptosu (Shay a Wright, 2000; Blasco, 2005; Artandi a de Pinho, 2010).

2.2.4 Angiogeneze

Angiogeneze je termín pro tvorbu nových krevních kapilár. Jsou důležité pro přívod kyslíku, živin a zároveň slouží k vylučování metabolitů a oxidu uhličitého. U zdravých tkání je angiogeneze aktivována pouze přechodně, např. při hojení ran a během menstruačního cyklu. U vznikajících nádorů se krevní zásobení nevyskytuje. Po dosažení určité velikosti nádoru, začnou nádorové buňky uvolňovat růstové faktory, což vede k indukci angiogeneze (Hanahan a Folkman, 1996). Jestliže je aktivita angiogeneze vysoká, dochází k progresi nádoru a zvyšuje se riziko metastáz (Bergers a Benjamin, 2003; Baeriswyl a Christofori, 2009). Angiogeneze je řízena faktory, které ji buď aktivují nebo inhibují. Mezi známé aktivátory angiogeneze patří např. vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), kyselý a bazický fibroblastový růstový faktor (FGF) [EC 2.7.10.1] a inhibitorem je např. thrombospondin-1 (TSP-1)

[EC 3.4.21.78]. Při nedostatku kyslíku (hypoxii) je aktivován transkripční faktor hypoxia inducible factor (HIF), který spouští gen *VEGF*, což vede k aktivaci angiogeneze (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2009).

Inhibitorem angiogeneze je TSP-1 fragment angiostatinu. Je aktivní v procesu ovulace a hojení ran. Váže se na transmembránový receptor endotelových buněk CD36 a je spojen s intracelulárními Src-like tyrosinkinasami [EC 2.7.10.2] (Bull *et al.*, 1994). U většiny lidských nádorů je exprese TSP-1 regulována p53. Inaktivace p53 způsobí pokles hladiny TSP-1 (Dameron *et al.*, 1994). Znakem inhibitorů je, že se v buňce nebo extracelulární matrix (ECM) nachází v neaktivní formě a aktivovány až následným proteolytickým štěpením (Whitelock *et al.*, 1996; Gately *et al.*, 1997).

Pro angiogenezi jsou důležité pericity, známé jako podpůrné buňky. Těsně přiléhají k vnější straně endoteliálních buněk a mají funkci mechanickou a fyziologickou (Bergers a Song, 2005; Raza *et al.*, 2010).

V současné době se angiogeneze nabízí jako terapeutický cíl pro většinu lidských nádorů. Cílem potlačení angiogeneze je zpomalení či zastavení růstu nádoru. Mezi používaná léčiva se řadí např. bevacizumab (monoklonální protilátka proti VEGF), sunitinib (tyrosinkinasový inhibitor) (Pérez-Santonja *et al.*, 2010; Almokadem a Belani, 2012).

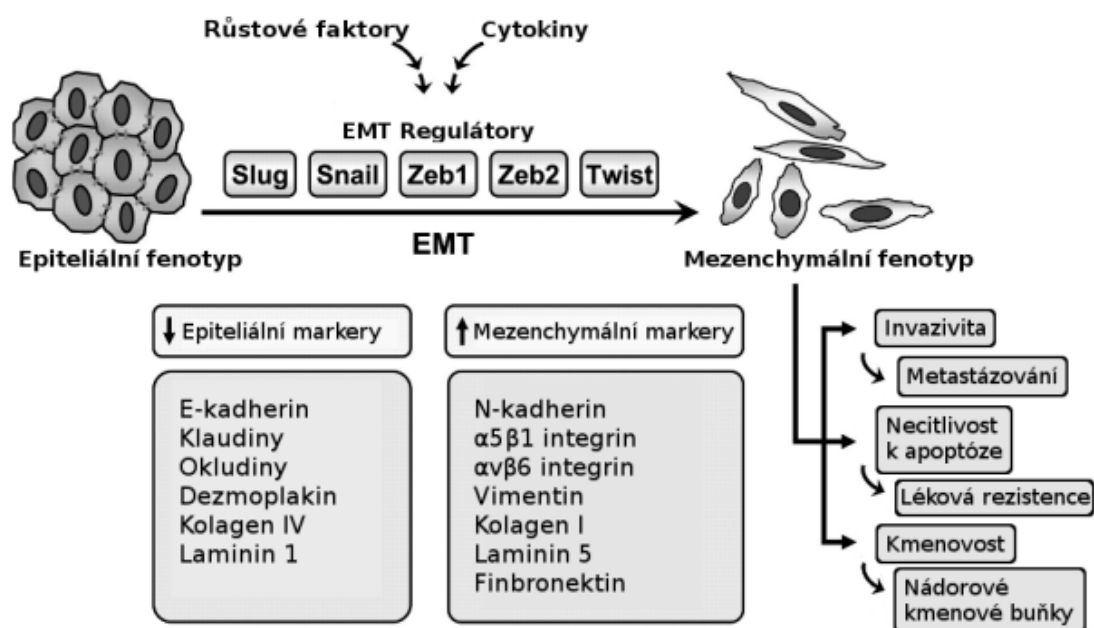
2.2.5 Invazivita a schopnost metastázovat

Dojde-li u normálních buněk ke ztrátě kontaktu s ECM, spustí se apoptosa tzv. anoikis. Během růstu různých typů nádorů může dojít k uvolnění nádorových buněk z primárního nádoru, ty putují přes ECM a bazální membránu do krevního systému. Opět prostupují bazální membránou krevního řečiště a ECM, nakonec vytvoří sekundární nádor. Metastázy se šíří třemi způsoby. Pomocí lymfogenních cév se nádorové buňky šíří do lymfatických uzlin (např. epitelální buňky). Při hematogenním šíření se nádorové buňky rozvádí cévním systémem. U porogenního typu dochází k šíření tělními dutinami (Fidler, 2003; Talmadge a Fidler, 2010).

Jedním z důvodů vzniku metastáz je snížená exprese adhezivních molekul (např. kadheriny, integriny, imunoglobiny). U epitelových tkání je nejčastější adhezivní molekulou E-kadherin, který zajišťuje kontakt mezi sousedními buňkami a přenáší antiproliferační signály mezi buňkami (Hanahan a Weinberg, 2000).

Dalším faktorem ovlivňující tvorbu metastáz je epitelální-mesenchymální přechod (EMT). Je to důležitý proces v embryonálním vývoji, a také se účastí hojení ran.

Principem je přeměna epiteliální buňky na mezenchymální (Obr. 3). Tento EMT přechod vede ke genetickým a biochemickým změnám (k aktivní invazivitě, zvýšené pohyblivosti nádorových buněk a rezistenci vůči apoptose). Mezi EMT regulátory můžeme zařadit např. Slug, Snail, Twist a ZEB1/2 (Yang a Weinberg, 2008; Schmalhofer *et al.*, 2009; Micalizzi *et al.*, 2010). Nádorové buňky, které podstoupily EMT během počáteční invaze a metastáz, mohou projít reverzním procesem tzv. mezenchymálním epiteliálním přechodem (MET) (Hugo *et al.*, 2007).



Obr. 3 Přehled epiteliálně mezenchymálního přechodu (EMT). EMT je indukován cytokiny či růstovými faktory, které regulují aktivitu transkripčních faktorů. Regulátory EMT vedou k přeměně epiteliální buňky na buňku mezenchymální, což vede ke zvýšení schopnosti invaze a metastáz, k lékové rezistenci a k tvorbě nádorových kmenových buněk (Shih a Yang, 2011).

2.2.6 Rezistence vůči signálům buněčné smrti

Naprogramovaná buněčná smrt (apoptosa) je fyziologický proces, důležitý pro udržení buněčné homeostázy a při embryogenezi. Apoptosu v jednotlivých buňkách spouští signály vedoucí přes několik kroků v buňce. Apoptosa způsobuje zmenšení objemu buňky a ztrátu kontaktu se sousedními buňkami. Morfologickým znakem apoptosy je kondenzace chromatinu, cytoplasmu a tvorba membránových váčků. Biochemickým pak fragmentace DNA a aktivace kaspasových proteas. Buňka se rozpadá na apoptotická tělíška různé velikosti, které jsou pak pohlceny buňkami, např. makrofágy (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980).

Apoptosa je regulována dvěma dráhami: vnější přes receptory smrti a vnitřní mitochondriální apoptotickou dráhou. Vnější dráha začíná vazbou signálních ligandů (FasL) na membránový Fas receptor (FasR). Receptory smrti [(FasR, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-R2 (TRAIL-R2)] pak aktivují kaspasové proteasy. FasR je např. exprimován natural killer buňkami (NK) a T-buňkami. Některé nádorové buňky na povrchu membrány vysoce exprimují FasR. Imunitní systém rozezná nádorové buňky a pomocí ligandů indukuje apoptosu (Lynch *et al.*, 1995; Ashkenazi a Dixit, 1998). Nádorové buňky časem díky snížené expresi receptorů (mutace) začínají unikat imunitnímu systému. Jedná se o možnou strategii, kdy nádory regulují apoptosu (Perez-Gracia *et al.*, 2014).

Vnitřní mitochondriální apoptotická dráha je v současné době zkoumána pro využití v léčbě nádorů. Vnitřní signál způsobený proteiny rodiny Bcl-2, způsobí změnu propustnosti vnější mitochondriální membrány. Proapoptotické proteiny Bcl-2 (Bax, Bak s aktivátory Bim/Bid) vytváří póry, kde z mezimembránového mitochondriálního prostoru pronikají rozpustné proteiny do cytosolu. Membránou difunduje cytochrom c, váže se na apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), mění konformaci a dovoluje vazbu dATP. Apaf-1 se dále mění a oligomerizuje (sedm podjednotek vytváří apoptosom), aktivuje prokaspasu-9, a ta pak aktivuje kaspasy. Antiapoptotické proteiny Bcl-2 inhibují aktivátor (Bim/Bid) a brání tvorbě pórů (Lowe *et al.*, 2004; Adams a Cory, 2007).

Buněčnou fyziologickou odpovědí apoptosy je autofagie. Vyskytuje se při nedostatečném přísunu živin a v určitém stavu buněčného stresu. Autofagie je fyziologický proces, vedoucí k degradaci buněčných organel (např. ribosomů, mitochondrií), které mohou být využity k následné biosyntéze a metabolismu energie. Autofagosomy způsobují degradaci buněčných komponent. Jedná se o intracelulární

váčky pohlcující organely a fúzí se s lysosomy. U nádorových buněk autofagie způsobuje jak přežití, tak i úmrtí buňky nacházející se ve stresovém prostředí s omezeným obsahem živin. Mezi autofagií, apoptosou a buněčnou homeostázou byla zjištěna podobná regulace. Jedná se o signální dráhy PI3K, Akt a mTOR, které jsou stimulovány signály, vedoucí k inhibici autofagie a blokování apoptosy. Hlavním regulátorem autofagie je Beclin-1, který obsahuje BH3 doménu, díky ní je schopen vázat Bcl-2/Bcl-xl proteiny (Mathew *et al.*, 2007; Mizushima, 2007; Levine a Kroemer, 2008; Sinha a Levine, 2008).

Druhým typem buněčné smrti je nekroza. Na rozdíl od apoptosy se nekrotické buňky zvětšují, prasknou a uvolní svůj obsah do okolního mikroprostředí. Nekroza uvolňuje prozánětlivé signály, vyvolá v okolních tkáních zánět. Nefyziologickým poškozením (např. hypoxií, hypotermií, metabolickými jedy nebo virovou infekcí) je vyvolána nekroza (Galluzzi a Kroemer, 2008; Grivennikov *et al.*, 2010; White *et al.*, 2010).

2.3 Další vlastnosti nádorové buňky

Hanahan a Weinberg (2011) přidali další 4 vlastnosti vedoucí ke vzniku nádorů: vyhnutí se imunitním mechanismům, reprogramování energetického metabolismu, podpůrná zánětlivá infiltrace, genomická nestabilita a mutace.

2.3.1 Reprogramování energetického metabolismu

Přeprogramováním buněčného energetického metabolismu dochází k proliferaci buněk i za nepříznivých podmínek. To způsobuje hypoxii, zvyšuje aktivitu HIF, umožňuje nádorovým buňkám přežít v nedostatku kyslíku. HIF je heterodimerický transkripční faktor indukovaný hypoxií. Skládá se z podjednotek HIF-1 α a HIF-1 β . Zvýšená exprese HIF ovlivňuje expresi dalších genů, to má za následek zvýšený energetický metabolismus glukosy (Chaika *et al.*, 2012). Za aerobních podmínek normální buňka zpracovává glukosu pomocí glykolysy na pyruvát v cytosolu a následně se uvolňuje oxid uhličitý v mitochondriích. Mechanismus anaerobní glykolysy v nádorech pozoroval Otto Warburg. Potvrdil tak, že jsou na rychlé glykolyse závislé (Warburg, 1956a, 1956b). Zvýšený příjem a využití glukosy v mnoha typech lidských nádorů bylo vizualizováno pomocí pozitronové emisní tomografie (PET) s radioaktivně značeným analogem glukosy (18F-fluorodeoxyglukosa). Bylo prokázáno, že glykolysa je spojena s aktivovanými onkogeny (*RAS*, *MYC*) a *TP53* (de Berardinis *et al.*, 2008; Jones

a Thompson, 2009). V nádorových buňkách je více GLUT transportérů, které slouží k lepší distribuci glukosy do buňky (Adekola *et al.*, 2012). Čím víc je transportéru, tím je nádor agresivnější a zvyšuje se riziko metastáz (Medina a Gareth, 2002).

Přestože HIF je aktivován hypoxií, významnou roli pro stabilizaci a aktivaci HIF mají reaktivní formy kyslíku (ROS; reaktive oxygen species). Oxidační stres způsobuje vznik nemocí i tvorbu nádoru. Nádorové buňky produkují ve větší míře ROS. Jedná se o skupiny vysoce reaktivních molekul zahrnující superoxid, singletový kyslík, peroxid vodíku, perhydroxylový radikál, hydroxylový radikál a hydroxylový ion. Látkami chránící buňky před oxidativním stresem jsou často antioxidanty (redukováný glutathion; thioredoxin; kyselina askorbová; α -tokoferol) a antioxidantní enzymy (glutathionperoxidasa [EC 2.5.1.18]; superoxidodismutasa [EC 1.15.1.1]; katalasa [EC 1.11.1.6]) (Pauwels *et al.*, 2007; Cherubini *et al.*, 2008). Hlavním zdrojem ROS jsou elektrony pocházející z mitochondrií za hypoxických podmínek. Zvýšená produkce ROS poškozuje jadernou a mitochondriální DNA, způsobuje peroxidaci lipidů, může vést k poškození mitochondriální membrány, tím k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytosolu. Vysoká hladina ROS způsobuje u normálních buněk apoptosu, zatímco nádorové buňky jsou vůči ROS rezistentní (López-Lázaro, 2009). Tvorba ROS ovlivňuje aktivitu signální dráhy MAPK, aktivitu transkripčního faktoru nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) a NF- κ B (Kovacic a Thurn, 2005; de Nicola *et al.*, 2011).

2.3.2 Podpůrná zánětlivá infiltrace

Po celém těle se nachází široké spektrum buněk imunitního systému (IS). IS udržuje rovnováhu vnitřního prostředí v těle. Organismus je neustále ohrožen patogenními mikroorganismy (bakterie, viry, houby a paraziti). Úkolem IS je nejen odstranění cizorodých, infekčních částic, poškozených buněk, ale musí být schopen rozpoznat vlastní orgány a tkáně. Imunita je vrozená (nespecifická) nebo získaná (specifická).

Vrozená imunita je prvotní fáze imunitní odpovědi na přítomnost cizorodých částic a nemá imunologickou paměť. Projevem vrozené imunity je zánět. Ten může přispět k vícenásobné tumorigenezi, dodává bioaktivní molekuly do nádorového mikroprostředí, včetně růstových faktorů, faktorů přežití, proangiogenních faktorů, indukčních signálů, vedoucí k aktivaci EMT, způsobuje také invazi a metastázu (de Nardo *et al.*, 2010; Grivennikov *et al.*, 2010). Zánětlivé buňky mohou uvolňovat

reaktivní druhy kyslíku, jsou mutagenní, v blízkosti nádorových buněk urychlují jejich vývoj směrem do maligního stavu (de Visser *et al.*, 2006; Qian a Pollard, 2010).

Získaná imunitní reakce je pozdější fáze imunitní odpovědi a navazuje na vrozenou imunitu. Získaná imunita má imunologickou paměť. Specifická imunitní odpověď je zajišťována T a B lymfocyty, které jsou aktivovány vazbou na specifické receptory se známým antigenem. B lymfocyty představují látkovou složku získané imunitní odpovědi a po kontaktu s antigenem produkují protilátky. T lymfocyty jsou buněčnou složkou, které po stimulaci antigenem produkují cytokiny, ovlivňující řadu dalších buněk a jejich chování.

IS dokáže rozpoznat nádorovou buňku a zlikvidovat ji, ještě dříve, než je nádor diagnostikován (Beutler, 2009).

2.3.3 Vyhnutí se imunitním mechanismům

Nádorové buňky mají schopnost vyhnout se kontrole buňkami imunitního systému pomocí mechanismů imunosuprese. Dochází ke snížení exprese hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), nádorových antigenů, kostimulačních molekul (aktivačního antigenu T-lymfocytů (CD80, CD86) nebo interferonu (IFN). Nádorové buňky mohou uvolňovat imunosupresivní molekuly např. cytokiny, chemokiny, IL-10, prostaglandin E2, nádorový růstový faktor (TGF) nebo VEGF, ty mohou potlačovat aktivaci T-lymfocytů. Nádorové buňky mohou uniknout imunologickým T a B lymfocytům a makrofágům, což vede k progresi nádorů (Hanahan a Weinberg, 2011; Schreiber *et al.*, 2011).

2.3.4 Nestabilita genomu a mutace

Důležitou roli u nádorových onemocnění hraje nestabilita genomu. Ta má pak za následek vznik řady různých mutací (v onkogenech a nádorově supresorových genech) vedoucích k transformaci normální buňky v buňku nádorovou. Genetická nestabilita je důvodem velké heterogenity nádorových populací. U nádorů můžeme pozorovat dva typy genetické nestability. Prvním je změna na úrovni sekvence DNA (bodové mutace). Častěji se vyskytuje typ genetické nestability, při kterém dochází ke změně na úrovni celé molekuly DNA – delece, inserce, translokace, amplifikace, aneuploidie (Artandi a de Pinho, 2010).

Za vznik mutací jsou zodpovědné různé faktory:

- fyzikální: např. ionizující záření (α , β , γ a rentgenové záření), UV záření, radioaktivita;

- chemické: např. toxiny (aflatoxin), radikály (NO);
- biologické
 - vnitřní: např. chyba DNA polymerasy, transposomy;
 - vnější: např. virová infekce;
- dědičné: Lynchův syndrom – mutace MutS protein homologu 2 (*MSH2*), mutL homolog 1 (*MLH1*), Li-Fraumeniho syndrom – mutace p53; Xeroderma pigmentosum (XP) – mutace *XP-A* až *XP-G*, Wilmsův nádor – mutace wilms tumor 1 (*WT1*) a další (Lane, 1992).

Nádory mají často mutovaný nádorový supresor p53 či pRb.

2.3.4.1 Protein p53

Protein p53 [EC 2.7.1.37], důležitý nádorový supresor, má významnou roli v rozhodování, zda má buňka proliferovat nebo navodit apoptosu. Nejdůležitější funkcí p53 je zastavení buněčného dělení před replikací DNA ve fázi G₁ nebo před mitosou ve fázi G₂. Protein p53 byl objeven v roce 1979 (Linzer *et al.*, 1979). Je umístěný na chromosomu 17p. Je nejvíce mutovaným genem u více než 50 % lidských nádorů (Harris, 1996). Tyto mutace se vyskytují v různých typech malignit, hematologických a solidních nádorů. Přítomnost mutantního proteinu p53 činí nádory často obtížně léčitelnými.

Pokud je p53 aktivován, zvyšuje se exprese cyklin dependentních kinas (Cdk; např. p21; [EC 2.7.11.37]) a dalších regulačních proteinů, které spouští signalizační kaskádu vedoucí k apoptose (Dey *et al.*, 2008). Lidský p53 je fosforylován na více místech proteinkinasami aktivovanými stresem a kinasami závislými na cyklinech. U normálních buněk je Cdk1 [EC 2.7.11.22] zodpovědná za zahájení mitosy a vstupu do M fáze z G₂ fáze. Regulace Cdk1 je založena na interakci s cyklinem B, fosforylací nebo defosforylací Cdk1 během buněčného cyklu (Morales *et al.*, 2007). Aktivace p53 je dána poškozenou DNA, abnormálními proliferačními signály, hypoxií či ztrátou buněčné adheze. Zatímco nádorové buňky mají deregulované signální dráhy, vedoucí k zastavení apoptosy.

Transkripce p53 je regulována přítomností mouse double minute 2 homologu (MDM2) [EC 2.3.2.27], jedná se o p53-indukovaný fosfoprotein, váže se na malou doménu na N-konci a negativně reguluje jeho aktivitu. Transkripce MDM2 je aktivována proteinem p53, kvůli tomu jsou v přítomnosti vysokých hladin p53 také zvýšené hladiny MDM2. MDM2 funguje jako ubikvitin ligasa (E3 ligasa)

[EC 2.3.2.27], dochází k exportu p53 z jádra do cytoplazmy, kde je následně v proteasomu degradován. Fosforylace p53 poskytuje stabilitu, MDM2 se nenaváže a dochází ke zvýšení exprese cílových genů (el-Deiry *et al.*, 1993; Mayo *et al.*, 2002).

2.3.4.2 Retinoblastomový protein

Dalším nádorovým supresorovým proteinem je pRb, který je zodpovědný za inhibici transkripce, řídí růst a vstup buňky z G₁ do S fáze. V G₁ fázi se pRb nachází v hypofosforylovaném stavu, proto na sebe váže regulační proteiny a transkripční faktory (EF2). pRb v komplexu s EF2 blokuje proliferaci a nemůže být zahájena transkripce. Zvýšená exprese cyklinu D a aktivace Cdk způsobí fosforylaci pRb a uvolnění transkripčního faktoru EF2, což vyvolá přechod do S fáze (Weinberg, 1995). Fosforylace pRB je pozitivně ovlivněna komplexy cyklinů D, E, Cdk2, Cdk4/Cdk6. Negativní regulací pRB jsou inhibitory CDK (CKI), které ovlivňují průběh buněčného cyklu. CKI jsou rozděleny do dvou skupin. Do první skupiny označované jako CIP (také WAF1)/KIP, patří inhibitory p21^{Cip1} (CDKN1a), p27^{Kip1} (CDKN1b) a p57^{Kip2} (CDKN1c). Druhou skupinou inhibitorů jsou INK4, které tvoří p16^{INK4a} (CDKN2a), p15^{INK4b} (CDKN2b), p18^{INK4c} (CDKN2c) a p19^{INK4d} (CDKN2d). CKI zastavují buněčný cyklus v G₁ fázi. Gen *CDKN2* je lokalizován na chromosomu 9 p21.3. Působí jako nádorový supresor při regulaci buněčného cyklu. Inhibitory *CDKN2* se navážou na CDK4/CDK6, pRB je v hypofosforylovaném stavu, což znemožní vstup buňky do S fáze. *CDKN2* patří k nejčastějším inaktivovavým genům u většiny lidských nádorů (Kim a Sharpless, 2006; Ullah *et al.*, 2009).

2.3.5 Heat shock protein

Heat shock proteins (HSPs), proteiny teplotního šoku, jsou molekulární chaperony, které se podílejí na udržování správné konformace proteinů v buňce. HSPs jsou evolučně vysoce konzervované proteiny, které byly objeveny v roce 1962 v buňkách larvy *Drosophily melanogaster* (Ritossa, 1962). Přítomnost HSPs byla potvrzena u širokého spektra druhů, od bakterií až po člověka. Veškeré eukaryotické a prokaryotické buňky mají schopnost exprimovat HSPs. HSPs mají na starosti opravovat proteiny, které jsou vystaveny stresovým situacím. Buňka za normálních podmínek má nízkou expresi HSPs. Zatímco nádorové buňky více exprimují HSPs, protože jsou vystaveny stresovým situacím (oxidativnímu stresu, mutacím, produkci ROS atd.). Pokud selže reparační mechanismus a degradační procesy v proteasomu, nahromadí se nefunkční proteiny, které vytvoří cytotoxické účinky na nádorové buňky.

HSPs se dříve dělily podle molekulové hmotnosti. V současné době rozlišujeme šest hlavních rodin HSPs, podle strukturní homologie: malé HSP, HSP40, HSP60 (chaperoniny), HSP70, HSP90 a HSP100. Poslední rodina obsahuje velké HSPs s molekulovou hmotností od 100 do 110 kDa. HSPs se nacházejí nejen cytoplasmě, ale i v různých buněčných kompartmentech (mitochondrii, jádře, endoplasmatickém retikulu). Existují i další chaperony a enzymy, např. proteindisulfidomerasa [EC 5.3.4.1], kalnexin, kalretikulin, které se účastní sbalování proteinů v drsném endoplasmatickém retikulu (Feder a Hafmann, 1999).

Nejrozšířenější chaperony typu HSP70 jsou charakterizovány molekulovou hmotností v rozmezí od 70 do 80 kDa. U eukaryotických organismů známe čtyři členy této rodiny: HSP72, HSP73, HSP75 a HSP78. Zvýšenou expresi HSP70 způsobují především abiotické stresové faktory (např. teplota, salinita, sucho nebo působení toxických látek). HSP70 se podílí na translaci, translokaci proteinů, účastní se na správném sbalení proteinů a potlačuje agregaci proteinů (Kregel, 2002; Wegele *et al.*, 2004).

Chaperonin HSP60 vytváří soudkovité útvary. Tvoří ho komplex GroEL a ko-chaperoninový protein GroES. Uzavřené proteiny uvnitř soudku vytváří ochranu pro správnou konformaci.

Rodina HSP70 s HSP60 byla podrobně prostudována u *Escherichia coli* (Horwich *et al.*, 2009).

Základní funkcí malých proteinů (HSP20) je zabránění nevratné agregace. HSP20 vyžadují spolupráci s dalšími chaperony a podílí se na dvojkrokovém sbalování proteinů (Nakamoto a Vigh, 2007). Do rodiny malých proteinů patří HSP27, který byl poprvé charakterizován v *Poeciliopsis lucida* (Norris *et al.*, 1997). HSP27 také ovlivňuje apoptosu tím, že inhibuje uvolnění cytochromu c z mitochondriální membrány, inaktivuje kaspasu 3 a 9, zabraňuje vazbu ligandů FAS a TNF na příslušné receptory. Protein HSP27 způsobuje tumorogenezi a má vliv na metastazování díky procesu EMT (Paul *et al.*, 2010; Shiota *et al.*, 2013).

Jedním z nejlépe charakterizovaných molekulárních chaperonů je HSP90 [EC 3.6.4.10]. HSP90 je všudypřítomný protein, který má zvýšenou expresi v nádorových buňkách, a je důležitý pro správné skládání několika onkoproteinů. HSP90 má 2-10x vyšší expresi v nádorové buňce oproti buňce normální (Gooljarsingh *et al.*, 2006). HSP90 se také podílí na udržení správné konformace, skládání, degradace a stability u více než 200 cílových proteinů (Trepel *et al.*, 2010). HSP90 využívá

k vykonávání svých funkcí více než 20 pomocných proteinů (ko-chaperony) (Kamal *et al.*, 2004).

V buňce se HSP90 nachází v homodimerní formě, skládá se ze dvou identických monomerů, z nichž každý obsahuje 3 domény: N-terminální, střední M-doménu a C-terminální doménu. N-terminální doména obsahuje ATP-vazebné místo, po navázání dochází ke změně konformace. Následnou hydrolýzou ATP na ADP dochází k vyvázání proteinu (Pearl a Prodromou, 2006). Střední M-doména identifikuje proteiny, C-terminální doména váže proteiny, ke kterému se váže ko-chaperon Hop (Hawle *et al.*, 2006). V nádorových buňkách je HSP90 přítomen výhradně v komplexech s vyšší aktivitou ATPasy, podílí se na zpracování onkoproteinů důležitých pro progresi nádoru (Workman, 2004).

U člověka má HSP90 dvě isoformy označované HSP90 α [EC 3.6.4.10], HSP90 β [EC 3.6.22.63] a fungují jako ATP-dependentní homodimery. Aktivita HSP90 α se zvyšuje při buněčném stresu a HSP90 β má konstantní aktivitu (Millson *et al.*, 2007).

2.3.5.1 Inhibitory Heat shock proteinu

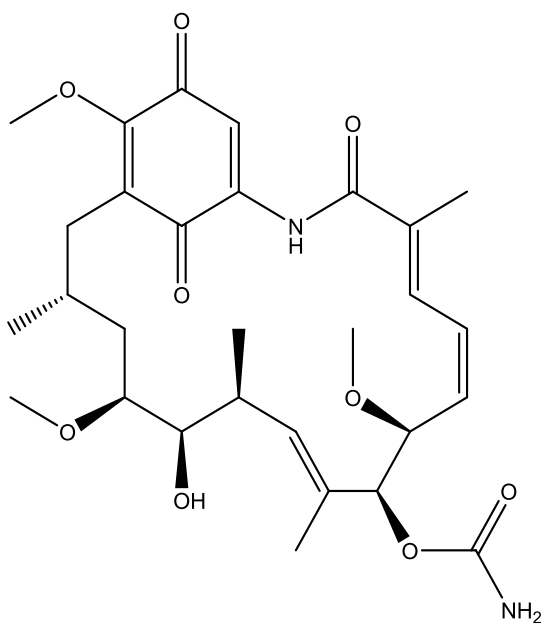
Byly nasyntetizovány specifické inhibitory HSP90, které se využívají jako potenciální terapeutika v klinických testech. Protinádorový účinek je založen na rozdílné citlivosti na inhibici HSP90. Nádorové buňky vykazují vyšší citlivost k inhibitorům HSP90 na rozdíl od normálních buněk. V nádorových buňkách inhibitory HSP90 snižují aktivitu onkoproteinů. Nefunkční proteiny přestanou být opravovány chaperony, buňka přestane proliferovat. Dochází k akumulaci buněk ve fázi G₂/M a následně jde buňka do apoptosy. Inhibice aktivity HSP90 ATPasy způsobuje degradaci proteinů prostřednictvím ubikvitin-proteasomové dráhy (Sharp a Workman, 2006).

2.3.5.2 Geldanamycin

Geldanamycin (GDN), benzochinonové ansamycinové antibiotikum, byl poprvé izolován z kultury *Streptomyces hygroscopicus* v roce 1970 (Obr. 4). GDN se původně používal jako antibiotikum, ale ukázalo se, že je neúčinné. V roce 1994 Whitesell *et al.* (1994) zjistili, že GDN inhibuje aktivitu HSP90. GDN má silnou protinádorovou aktivitu a prochází přes hematoencefalickou bariéru (HEB) (Zagzag *et al.*, 2003). Ukázalo se, že GDN je příliš cytotoxická látka pro léčbu pacientů multiformního glioblastomu (GBM), proto byla nasyntetizována různá analoga GDN s lepšími farmakologickými vlastnostmi, se sníženou cytotoxicitou, a aby byl zachován jako inhibitor HSPs (Sydor *et al.*, 2006). GDN inhibuje molekulární chaperon HSP90,

zabraňuje správnému skládání onkoproteinů, což vede k destabilizaci proteinů až následné apoptose (Webb *et al.*, 2000).

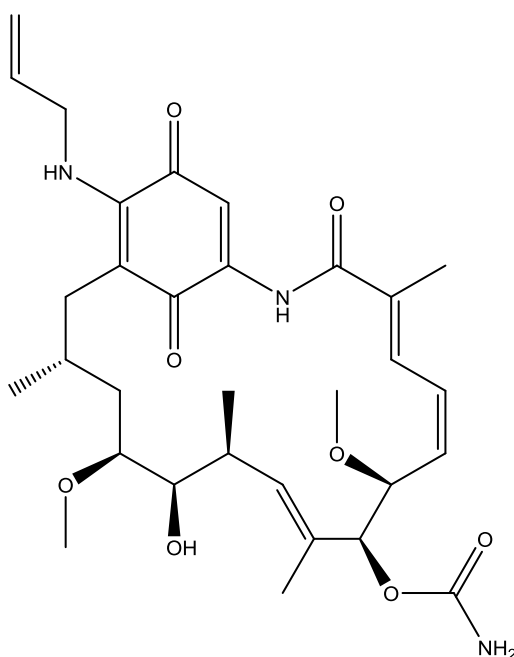
Rentgenová krystalová struktura komplexu HSP90/GDN dokázala, že GDN se váže na N-terminální vazebnou doménu ATP, což inhibuje jeho aktivitu HSP90 (Grenert *et al.*, 1997; Stebbins *et al.*, 1997).



Obr. 4 Geldanamycin ((4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-13-hydroxy-8,14,19-trimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]dokosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl karbamát).

2.3.5.3 Tanespimycin

17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) derivát ansamycinového antibiotika geldanamycinu, se využívá jako účinné antiproliferační činidlo (Obr. 5) (Adams a Elliot, 2000). 17-AAG inhibuje růst buněčných linií lidského gliomu a nádorových kmenových buněk gliomu. Využívá se k léčbě GBM (Sauvageot *et al.*, 2009). V klinické praxi je 17-AAG málo využíván z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě a krátkého biologického poločasu (Saxena a Hussain, 2013). Jeho rozpustnost ve vodném roztoku činí 50 %, proto se využívá organosírová kapalina dimethylsulfoxid (DMSO) (Sausville *et al.*, 2003). Vysoké množství DMSO ale způsobuje u pacientů nežádoucí účinky (nauzea, zvracení a zápach), má hepatotoxické a kardiotoxické účinky (Davis *et al.*, 1990; Zambelli *et al.*, 1998). Oproti GDN, který je hepatotoxický *in vivo*, 17-AAG má sníženou cytotoxicitu a účinně inhibuje HSP90 (Sausville *et al.*, 2003). 17-AAG blokuje ATPasovou aktivitu HSP90 navázáním do ATP-vazebného místa (Schneider *et al.*, 1996; Neckers *et al.*, 1999; Roe *et al.*, 1999).



Obr. 5 Tanespimycin ([*(3S,5S,6R,7S,8E,10R,11S,12E,14E)*-21-(allylamino) -6- hydroxy- 5,11-dimethoxy-3,7,9,15-tetramethyl-16,20,22-trioxo-17-azabicyklo [16.3.1] dokosa-8,12,14,18,21-pentaen-10-yl] karbamátu).

Další sloučeninou je 17-dimethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG; alvespimycin), který má lepší rozpustnost ve vodě než 17-AAG. Zvýšením rozpustnosti došlo ke zvýšení cytotoxicity ve srovnání s 17-AAG (Eiseman *et al.*, 2005).

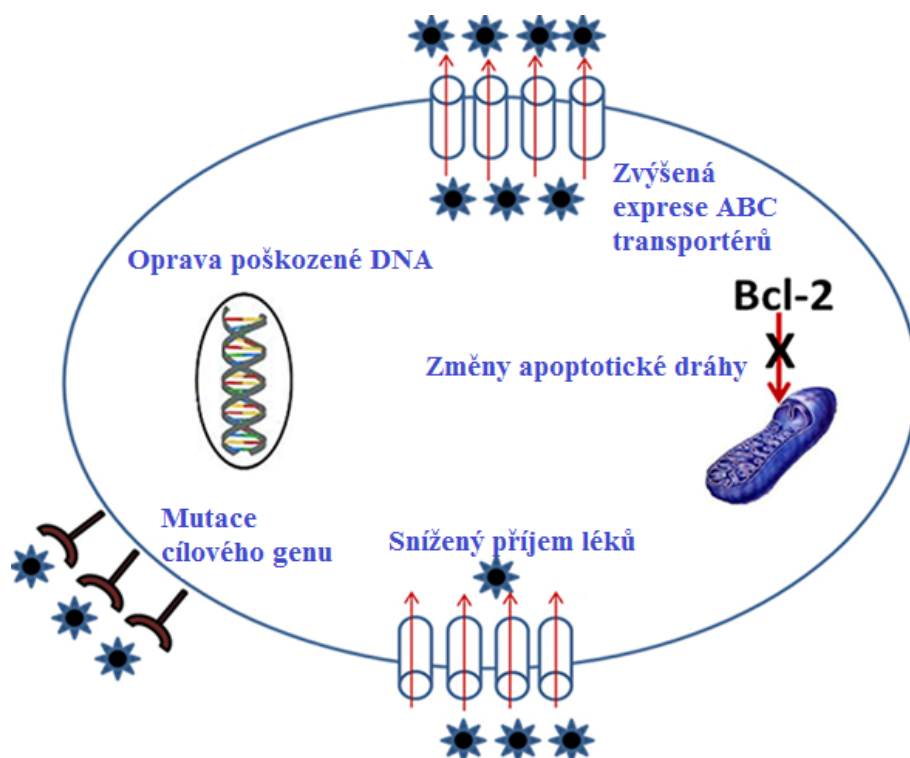
Následujícím analogem je retaspimycin (IPI-504), vysoce rozpustný hydrochlorid hydrochinonu, který byl nasyntetizován jako inhibitor HSP90 se slibnými farmaceutickými vlastnostmi (Sydor *et al.*, 2006). IPI-504 se využívá v klinických testech u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. V dalších studiích bylo zjištěno, že IPI-504 vykazuje hepatotoxicitu (klinická studie u pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem) (Sequist *et al.*, 2010).

2.3.6 Léková rezistence

Mezi hlavní příčiny selhání léčby u nádorových onemocnění patří léková rezistence. Chemoterapie je jednou z nejpoužívanějších metod v léčbě maligních nádorů, ale výsledek a prognóza je pro pacienty nadále špatná. Prostřednictvím různých mechanismů si nádorové buňky postupně vytvářejí odolnost vůči všem chemoterapeutickým lékům. Léková rezistence může být: primární (přirozená) a sekundární (získaná). Primární rezistence se projeví ihned po prvním podání léčiva. Sekundární se rozvíjí až v průběhu léčby, kdy dochází ke snížení koncentrace léčiva v buňce (Skovsgaard, 1978). Existují i případy, kdy se v průběhu chemoterapie nádorové buňky stávají rezistentní vůči danému léčivu (Obr. 6). Jedná se o MDR a mezi hlavní příčiny vzniku jsou:

- a) mutace cílového místa (inhibitory tyrosinkinas);
- b) změny v regulaci buněčného cyklu a necitlivost k signálům buněčné smrti;
- c) zvýšená aktivita genů, které ovlivňují detoxikaci léčiv (např. cytochrom P450);
- d) změny v regulaci buněčné smrti (zvýšená exprese antiapoptotických proteinů např. protein Bcl-2);
- e) změny v transportu vedoucí ke snížení hladiny látek v buňce (zvýšená exprese ABC transportéru);
- f) další mechanismy vedoucí ke vzniku MDR (např. lysosomální sekvence).

U nádorových buněk je exprese ABC transportérů zvýšená, což je jednou z hlavních příčin vedoucí ke vzniku MDR (Gottesman *et al.*, 2002).

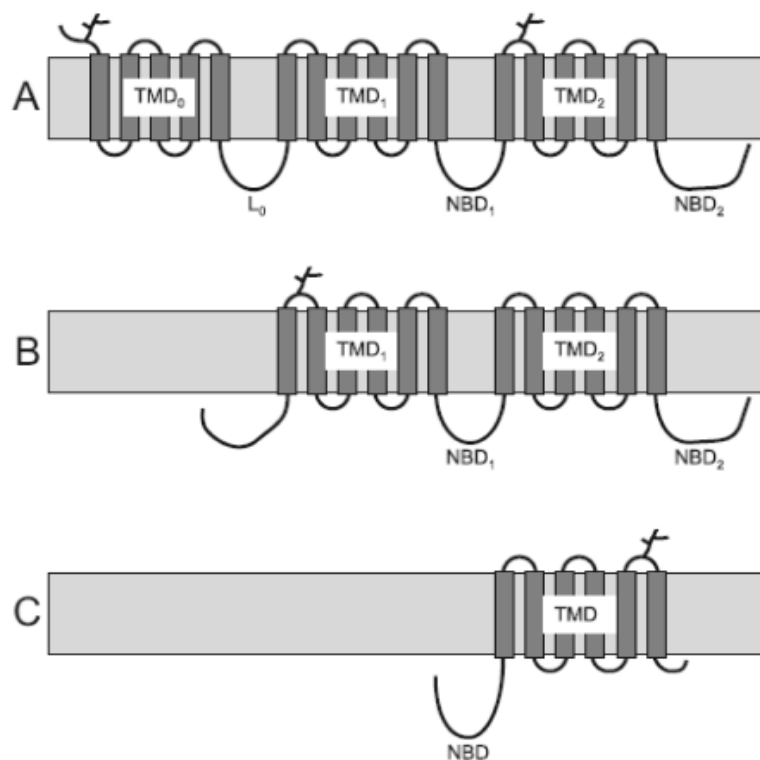


Obr. 6 Možné mechanismy vzniku mnohočetné lékové rezistence v buňce. Ke vzniku rezistence vůči chemoterapeutikům dochází hlavně díky mutacím cílového genu. Primární i získaná rezistence je způsobena změnami v transportu léčiv, zvýšenou expresí ABC transportérů, sníženým příjmem léčiv, změnou apoptotické dráhy (zvýšená exprese antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2) a zvýšenou opravou DNA (upraveno podle Kapse-Mistry *et al.*, 2014).

2.3.7 ABC transportéry

ABC transportéry [EC 3.6.3.44] jsou transmembránové proteiny, rozdělené do sedmi odlišných podrodin od A - G. Bylo zjištěno, že lidský genom kóduje 49 ABC transportérů. Funkcí lidských ABC transportérů je transport substrátů (aminokyselin, lipidů, anorganických iontů, sacharidů, léčiv, peptidů a proteinů) hydrolýzou ATP přes membránu proti koncentračnímu gradientu (Jones a George, 2004). Pokud dochází k nadměrné expresi ABC transportérů, stávají se nádorové buněčné linie rezistentními vůči chemoterapeutikům (Sajid *et al.*, 2018). Eukaryotické ABC geny byly charakterizovány v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans* (Dean *et al.*, 2001).

Mezi nejčastější zkoumané transmembránové proteiny (Obr. 7) patří ABCB1 (P-glykoprotein; P-gp; MDR1), ABCC1 (multidrug resistance protein; MRP1) a ABCG2 (breast cancer resistance protein; BRCP; Miller, 2015).



Obr. 7 Schématické znázornění uspořádání lidských ABC transportérů: ABCB1 (a), ABCG2 (b), ABCG2 (c). ABC transportéry se skládají z transmembránových domén (TMDs), nukleotid vázajících domén (NBDs) a smyčky (L₀, loop) (Kunjachan *et al.*, 2013).

2.3.7.1 ABCB podrodina

Podrodinu ABCB tvoří 11 transportérů. ABCB1 transportér je nejdůležitějším členem této podrodiny. Julian a Ling v roce 1976 poprvé popsali ABC transportér P-gp, který byl vyizolovaný z ovariálních nádorových buněk čínských křečků rezistentních na kolchicin. P-gp je multi-specifická efluxní transmembránová pumpa. Jeho nadměrná exprese a funkčnost je jednou z hlavních příčin MDR. Jedná se o 170 kDa velký transportní protein. Ze strukturního hlediska je P-gp monomer, skládá se ze dvou transmembránových domén (TMDs) a dvou nukleotid vázajících domén (NBDs) (Chufan *et al.*, 2015). Transportuje celou řadu hydrofobních a amfipatických sloučenin včetně protinádorových léčiv (Sharom, 2008; Sajid *et al.*, 2018). P-gp transportuje přirozené substráty, např. cytokiny, lipidy, steroidní hormony a peptidy. Mezi přenášená chemoterapeutika patří např. doxorubicin, daunorubicin, vinblastin, vinkristin, digoxin a taxol (Dean *et al.*, 2001). Dalšími přenášenými látkami jsou antibiotika, blokátory vápenatých kanálů, kardioaktivní glykosidy, imunosupresivní látky, antiepileptika a toxiny (Shityakov *et al.*, 2013). P-gp se nachází v epiteliálních buňkách střeva, ledvin, jater, placenty a nadledvinek (Ambudkar *et al.*, 1999). P-gp je nadměrně exprimován

na povrchu endotelových buněk HEB, chrání CNS před působením neurotoxinů a udržuje homeostázu (Abdullahi *et al.*, 2017). Nadměrná exprese P-gp je spojena se špatnou prognózou v léčbě kolorektálního karcinomu, nádoru jater, slinivky břišní, hematopoetického systému (myelomu, lymfomu, leukémií) a močového měchýře (Goldstein *et al.*, 1989; Borst *et al.*, 2000).

Na regulaci aktivity P-gp se využívají inhibitory ABCB1, které jsou rozděleny do tří generací. Inhibitory zablokují P-gp, což způsobí zvýšenou koncentraci cytotoxické látky uvnitř buňky. Do první generace řadíme verapamil a cyklosporin A, jedná se o kompetitivní inhibitory s nízkou specifitou a účinností. Příkladem druhé generace je valsopodar, má vyšší účinnost, ale problémem je jeho nespecifičnost. Třetí generace obsahuje nekompetitivní inhibitory, patří zde zosuquidar (ZSQ) (Dantzig *et al.*, 1996), elacridar (Hyafil *et al.*, 1993), tariquidar (Roe *et al.*, 1999) či laniquidar (Thomas a Coley, 2003). Oproti ostatním generacím se vyznačují lepší specifitou, nízkou cytotoxicitou a vysokou účinností.

2.3.7.2 ABCC podrodina

Podrodinu ABCC tvoří 12 transportérů. Jsou významnými transportéry pro různé skupiny organických aniontů konjugované s redukováným glutathionem (GSH), glukoronidem nebo sulfátem. Nejvýznamnějším členem je ABCC1, který je spojen s rezistencí na více léků. Poprvé byl charakterizován v roce 1992 v buněčné linii karcinomu plic, která byla vystavena opakovaně působení doxorubicinu (Cole *et al.*, 1992). Mezi významné chemoterapeutické sloučeniny patří vinkristin, doxorubicin, etoposid, irinotekan, mitoxantron a methotrexat (Munoz *et al.*, 2007). Nachází se v luminální membráně endotelových buněk, transportuje substráty z mozku ven (Strazielle a Ghersi-Egea, 2013). ABCC1 je všudypřítomný transportér, vyskytuje se např. v ledvinách, plicích, močovém měchýři, nadledvinkách, tlustém střevě, placentě, slezině, žaludku, varlotech, HEB, erytrocytech, kostní dřeni a ve svalových buňkách (Wijnholds *et al.*, 1998).

Bylo zjištěno, že zvýšená exprese ABCC1 byla nalezena u pacientů s karcinomem prsu (Filipits *et al.*, 2005), nemalobuněčného karcinomu plic (Li *et al.*, 2009), akutní myeloidní leukémií (Schaich *et al.*, 2005) a akutní lymfoblastické leukémií (Plasschaert *et al.*, 2005).

Inhibitorem pro ABCC1 mohou být různé flavonoidy či biricodar (Boumendjel *et al.*, 2005).

2.3.7.3 ABCG podrodina

Do podrodiny ABCG patří ABCG2 transportér. ABCG2 byl poprvé identifikován v nádorové buněčné linii inkubován s doxorubicinem (Doyle *et al.*, 1998). Jedná se o „poloviční“ transportér (75 kDa), obsahuje 655 aminokyselin, tvoří ho jedna NBD a jedna TMD (Ni *et al.*, 2010). Ovlivňuje farmakokinetiku mnoha běžně užívaných léků. Jeho zvýšená exprese ovlivňuje špatnou prognózu léčby nádorových onemocnění MDR (Jackson *et al.*, 2018). Transportuje široké spektrum substrátů, včetně významných chemoterapeutik (mitoxantron, methotrexát, kamptothecin topotekan, irinotekan, etoposid a doxorubicin) (Bram *et al.*, 2009a, b; Mao a Unadkat, 2015). Kromě známých cytotoxických látek jsou substráty ABCG2 také inhibitory tyrosinkinás (imatinib, gefitinib a nilotinib) (Dohse *et al.*, 2010; Hegedus *et al.*, 2012). Nachází se na luminální membráně endotelových buněk (Fan a Liu, 2018). Bývá exprimován v gastrointestinálním traktu, hematopoetických kmenových buňkách, placentě, plicích, játrech, ledvinách, prostatě a HEB (Doyle *et al.*, 1998; Miyake *et al.*, 1999; Robey *et al.*, 2018).

Většina studií ohledně ABCG2 na MDR byla zkoumána u pacientů s akutní myeloidní leukémií a s nádorem prsu a plic (Natarajan *et al.*, 2012; Mao a Unadkat, 2015).

Problém s MDR se řeší použitím inhibitoru, který zabraňuje cytotoxickým látkám ven z buněk. Prvním inhibitorem pro ABCG2 byl fumitremorgin C (FTC). V dnešní době se nevyužívá kvůli nežádoucím neurotoxickým účinkům (Gekeler *et al.*, 1995). Proto byly vyvinuty syntetické analogy FTC se sníženou cytotoxicitou např. KO143 (Allen *et al.*, 2002) a PZ-39 (Peng *et al.*, 2009).

2.4 Multiformní glioblastom

Nádory se dělí podle orgánu, ve kterých se vyskytují. K nejčastějším nádorovým onemocněním patří karcinom plic a kolorektální karcinom. Česká republika se řadí mezi státy s nejvyšším výskytem nádorových onemocnění ve světě. Muže nejčastěji postihuje kolorektální karcinom, karcinom plic, prostaty, průdušnice a průdušek. U žen je nejčastěji diagnostikován karcinom prsu, kolorektální karcinom, karcinom dělohy, zhoubné nádory průdušnice, průdušek a plic.

K méně častým řadíme nádor slinivky břišní a nervové tkáně, které tvoří 1 % nádorů. GBM je vysoce agresivní nádorové onemocnění se špatnou prognózou (Gladson *et al.*, 2010; Onconet, 15. 3. 2019).

2.4.1 Epidemiologie a etiologie

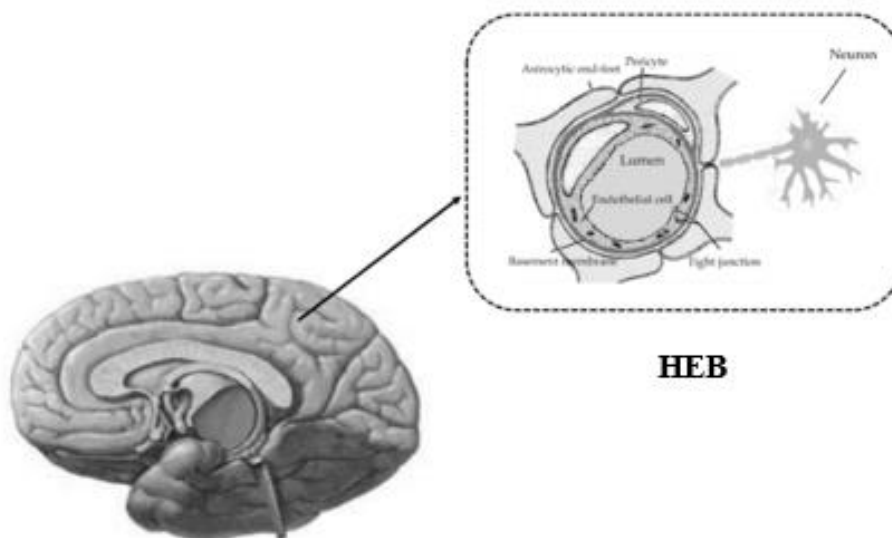
Multiformní glioblastom je nejagresivnější maligní primární mozkový nádor u dospělých osob mezi 45-75 lety s incidencí 3-4 případů na 100 000 osob za rok (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 13. 11. 2018). Prognóza pro pacienty je nadále špatná, průměrná doba přežití je jeden rok. Po úspěšné léčbě se kolem 3 let dožívá 3-5 % pacientů (Krex *et al.*, 2007). K rizikovým faktorům vedoucím ke vzniku multiformního glioblastomu patří např. působení chemických látek, terapeutické ionizující záření (Navas-Acién *et al.*, 2002). U dětí, které byly ozařovány během léčby leukémie, se zvyšuje riziko mozkových nádorů včetně GBM (Krishnan *et al.*, 2010; Galloway *et al.*, 2011).

Gliomy byly rozděleny podle původu vzniku na pilocytický astrocytom, gangliogliom, difúzní (fibrilární) astrocytom, anaplastický astrocytom, oligodendrogliom, anaplastický oligodendrogliom a GBM. Nejhorší prognóza je spojena s gliomy astrocytického původu, zatímco gliomy s oligodendroglíálním původem mají vyšší citlivost k chemoterapii. Nádory jsou rozděleny do 4 skupin podle malignity (I-IV). I-II skupina (low grade glioma) označuje benigní formu nádoru, III-IV (high grade glioma) je typ maligní. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) patří GBM, astrocytom IV. stupně, mezi nejagresivnější maligní mozkové nádory. Tento typ nádoru je charakterizován extrémní invazí, mitotickou aktivitou, jadernou atypií, mikrovaskulární proliferací, trombózami a nekrosou (Louis, 2006).

2.4.2 Hematoencefalická bariéra

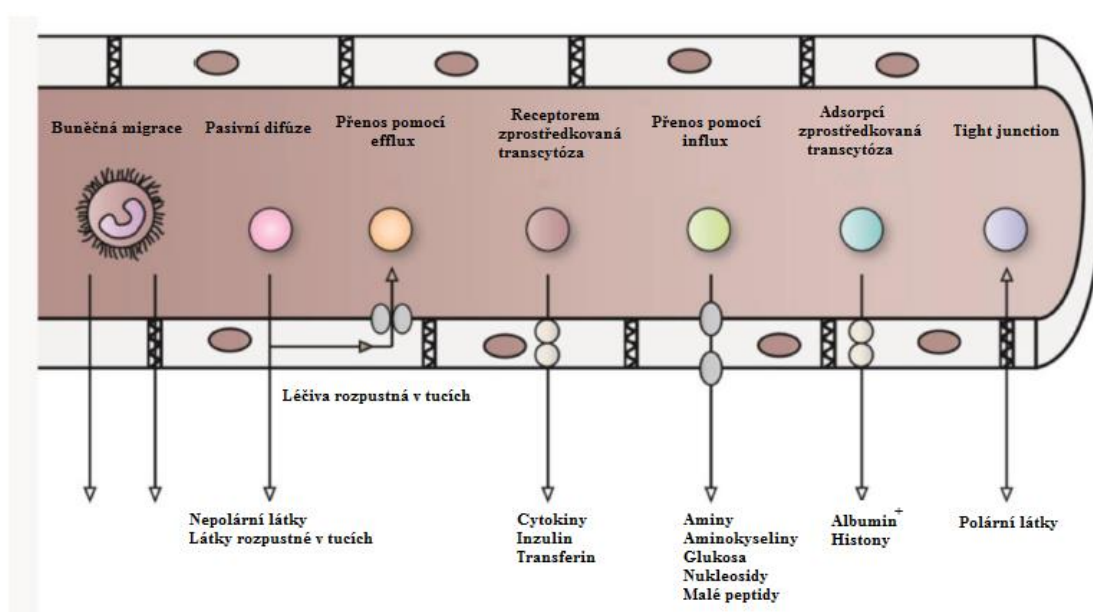
Po úspěšné resekci nádorové tkáně se podává chemoterapie. Ta umožňuje průnik cytostatik přes HEB. Mozek je chráněn před neurotoxickými látkami HEB, difúzní bariérou mezi CNS a krevním oběhem (Parkin, 2001). První zmínku o existenci HEB popsal Paul Ehrlich, který zjistil, že po vstupu barviva do krevního oběhu dojde k zabarvení všech orgánů mimo mozek a míchu. Následně Ehrlichův student Edwin Goldmann toto tvrzení vyvrátil. Zaváděl do buněk mozkomíšního moku injekcí trypanovou modř a došlo k obarvení mozkových buněk. Do ostatních buněk v periferních tkáních se barvivo nedostalo. Tím dokázal, že existuje bariéra mezi CNS a krevním oběhem (de Vries *et al.*, 1997). V 60. letech Reese a Karnovsky popsali lokalizaci HEB na úrovni endotelových mozkových kapilár pomocí křenové peroxidasy [EC 1.11.1.7] (Reese a Karnovsky, 1967).

HEB je tvořena endotelovými buňkami kapilár, které nasedají na bazální membránu, ke které jsou připojeny astrocyty, pericyty, tight junction a celkově vytváří "neurovaskulární jednotku" (Obr. 8) (Redzic, 2011).



Obr. 8 Hematoencefalická bariéra (HEB) rozděluje mozkový parenchym od krevního oběhu. Neurovaskulární jednotku tvoří bazální membrána, která obklopuje endotelové buňky mozkových kapilár. Obsahuje nepravidelně umístěné pericyty a těsné spoje (tight junction). K endotelovým buňkám se připojují koncové výběžky astrocytů (upraveno podle Fan a Liu, 2018).

Vážným problémem při léčbě gliomu je to, že HEB omezuje vstup léčiva, proto dochází ke klinické rezistenci vůči chemoterapeutickým léčivům. Využívá se terapeutických činidel, které dodávají cytostatika z krve do mozku. Zlepšení transportu terapeutických látek přes HEB lze dosáhnout inhibicí efluxních transmembránových proteinů (Miller a Kabanov, 1999; Batrakova *et al.*, 2001). HEB je propustná pro O₂, CO₂, He, Xe, N₂ a dalších plynných anestetik. Látky rozpustné v lipidech mohou za fyziologických podmínek procházet pasivní difúzí. Proteiny a peptidy se dostávají do mozku pomocí adsorpcí zprostředkovanou transcytózou (AMT) a receptorem zprostředkovanou transcytózou (RMT). Menší peptidy mohou procházet HEB endocytózou nebo mechanismem RMT. Polární molekuly např. glukosa, aminokyseliny či nukleosidy nemohou procházet difúzí přes buněčnou membránu. Využívají se specifické transportní proteiny, pro glukosu je využíván GLUT1 (Obr. 9) (Pardridge, 2005).



Obr. 9 Potencionální cesty transportu v hematoencefalické bariéře (HEB). Buňky mohou procházet přes HEB pasivním nebo aktivním transportem. Nepolární a látky rozpustné v tucích prochází pasivním transportem difúzí přes buněčnou membránu. Polární molekuly, glukosa, aminokyseliny, nukleosidy pronikají do CNS díky aktivního transportu. Receptor zprostředkovaná transcytóza transportuje makromolekuly (peptidy, proteiny). Adsorpcí zprostředkovaná transcytóza prochází kladně nabitě makromolekuly přes HEB. Buněčnými spoji (tight junction) dochází k propojení buněk a transportují se polární látky (upraveno podle Serlin *et al.*, 2015).

2.4.3 Diagnostika

K diagnostice nádorů CNS se používá výpočetní tomografie (CT). Přístroj zobrazuje mozek v různě silných řezech a může tak přesně nádor lokalizovat. Jinou metodou pro stanovení léčby maligního gliomu je magnetická rezonance (MR). Poskytuje přesnější obraz a umožňuje zobrazení mozku ve více rovinách. Pro zvýšení intenzity se podává kontrastní látka. Nevýhodou MR jsou vyšší náklady a časová náročnost ve srovnání s CT. MR je založená na jiném principu než CT. Kvůli magnetickému poli nelze vyšetřovat pacienty s kardiostimulátorem nebo s kovovým materiálem v těle. Problémem je, že pomocí CT a MR nelze úplně určit přesnou hranici nádoru od zdravé mozkové tkáně.

Pro přesné určení typu nádoru se využívají histologická vyšetření a stereotaktická biopsie. Odebraná mozková tkáň se vyhodnocuje pod mikroskopem, zjistí se tak definitivně, zda je nádor benigní nebo maligní povahy. Onkologická léčba by neměla začít bez histologického potvrzení (Helseth, 1995; Legler *et al.*, 1999; Linet *et al.*, 1999). Další zobrazovací technikou je PET, která slouží ke zlepšení diagnostických metod v léčbě maligního gliomu. V PET je ^{11}C -methyl methionin nejpoužívanější aminoskupinou pro vyhodnocení mozkových nádorů (Miwa *et al.*, 2004). V současné době pokročilé metody MR, CT a PET zlepšují kvalitu léčby a výsledky pacientů v léčbě GBM (Höckel a Vaupel, 2001; Fink *et al.*, 2015).

Nefunkčnost HEB vede ke snížení exprese ABC transportérů v endotelových buňkách a může vyvolat různé patologické změny. V klinických studiích byly zvýšené některé zánětlivé markery včetně interleukinu-1 (IL-1), interleukinu-6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) v plazmě (Jalan *et al.*, 2004). Pokud se buňka nachází ve stresové situaci, vylučuje HEB, např. TGF, neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie (GDNF) nebo FGF (Fan a Liu, 2018).

2.4.4 Standardní léčba

V současné době standardní léčbu GBM tvoří chirurgická resekce, po níž následuje léčba radiační terapií (RT), chemoterapeutickým alkylačním činidlem temozolomidem (TMZ), což umožňuje zvýšit dobu přežití o jeden rok (Madajewicz *et al.*, 2000). Stupp *et al.* V roce 2005 zavedl úspěšnou metodu pro léčbu GBM. Snahou je co nejlépe odstranit největší část nádoru, po které následuje souběžná aplikace TMZ (75mg/m²/den) s radioterapií (60 Gy). Následně se podává šest cyklů TMZ (150-200 mg/m²/den) po dobu pěti dní po osmiadvaceti dnech. Získaná rezistence

vůči léčivům patří mezi hlavní překážky pro úspěšnou léčbu nádoru. U chirurgického zákroku je rozhodujícím prognostickým faktorem radikalita výkonu. Před operací se pacientovi podává perorálně např. kyselina 5-aminolevulová. Aby se vyloučilo krvácení nebo residua nádorů, je třeba do 48-72 h po operaci provést znovu CT nebo MR (Pichlmeier *et al.*, 2008; NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 13. 11. 2018).

2.4.4.1 Temozolomid

TMZ je nejdéle používaným cytostatikem a patří mezi alkylační činidla. Používá se jako účinný lék pro pacienty s GBM, protože může projít HEB (Friedman *et al.*, 2000). TMZ (Obr. 10) při fyziologickém pH podléhá hydrolyze na vlastní aktivní metabolit 5-(3-dimethyl-1-triazenyl)imidazol-4-karboxamid (MTIC), který způsobuje metylaci (Koukourakis *et al.*, 2009). Methylace v DNA na O⁶ pozici guaninu je cytotoxická a při replikaci dochází k záměně (methyl)guaninu za adenin (Trivedi *et al.*, 2005). Zasahuje do replikačního procesu, což vede k tvorbě zlomů na dvouvláknovém řetězci DNA, celkově se zpomaluje růst gliových buněk, nakonec dochází k apoptose (Günther *et al.*, 2003). Mezi vlákny DNA se vytvoří příčné vazby, které inhibují buněčný DNA-reparační protein O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferasu (MGMT). MGMT je reparační enzym, který se podílí na opravě DNA. Odstraňuje methylovou skupinu na pozici O⁶ guaninu z poškozené DNA, methylová skupina je přenesena na cystein (Kaina *et al.*, 2007). Tato reakce je nevratná, později je ubiquitovaná a zničena v proteasomu (Ludlum, 1990).

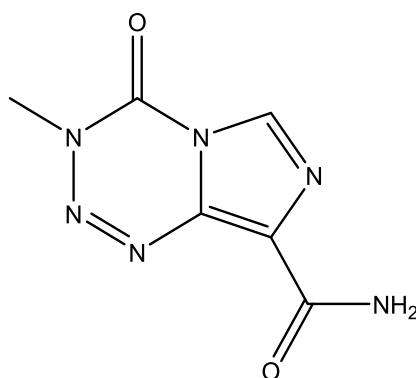
Přibližně 60 % GBM má nemetylovanou promotorovou oblast *MGMT*, což vede k nadměrné expresi *MGMT* opravující DNA, která je zodpovědná za rezistenci nádorů na chemoterapii TMZ (Smalley *et al.*, 2014). U několika buněčných linií GBM, které měly různou expresi *MGMT*, byla zjištěna zvýšená citlivost na TMZ (Khan *et al.*, 2008). Studium zaměřené na léčbu GBM přineslo poznatky o molekulárních biomarkrech, které byly zařazené do klinické praxe. Prvním markerem byl O⁶-methylguanilmethyltransferasa [EC 2.1.1.63] (McLendon *et al.*, 2008).

I když TMZ patří mezi dobře snášená cytostatika, je třeba se vyhnout vysokým dávkám, protože může dojít k myelosupresi (Agarwala a Kirkwood, 2000). Proto kombinace nižších dávek TMZ s inhibítorem např. lomeguatribem (LMB), může zvýšit terapeutický účinek TMZ (Taspinar *et al.*, 2013).

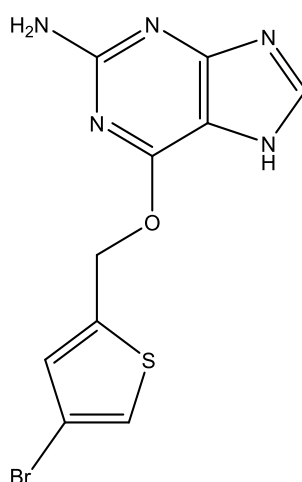
TMZ se podává perorálně, dochází k rychlému a úplnému absorbování. Účinná látka rychle vstupuje do mozkomíšního moku (Lanzetta a Minniti, 2010).

2.4.4.2 Lomeguatrib

Lomeguatrib (LMB) je netoxická nízkomolekulární protinádorová chemoterapeutická sloučenina, která se využívá v klinických testech jako inhibitor pro MGMT. Inaktivuje enzym a inhibuje opravu DNA u mnoha nádorových buněčných linií. LMB (Obr. 11) se podává společně s TMZ, čímž dochází ke zvýšení účinnosti chemoterapeutika. Kombinací léčiv TMZ a LMB v glioblastomových buňkách dochází ke snížení aktivity MGMT a zvýšení exprese p53, což vede k fragmentaci DNA a následné apoptose. Taspinar *et al.* (2013) uvedli, že LMB s TMZ lze použít pro léčbu GBM.



Obr. 10 Temozolomid (4-methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyklo[4.3.0]nona-2,7,9-trien-9-karboxamid).



Obr. 11 Lomeguatrib (2-amino-6-[(4-bromo-2-thienyl)-methoxy]-9H-purin).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Buněčné linie

Nádorové buněčné linie GBM T98G, U87 a H4 byly vybrány s rozdílnou genetickou variabilitou (Tab. 4). Mezi nejdůležitější mutace patří např. *CDKN2A*, *PTEN*, *MGMT* a *TP53*. Buněčná linie U87, H4 byla získána z ATCC (American Type Culture Collection), T98G z ECACC (European Collection of Cell Cultures). Buňky T98G a H4 měly zvýšenou expresi *MGMT*, jsou rezistentní na přidavek TMZ. Zatímco buňky U87 měly nízkou expresi *MGMT* (Lee *et al.*, 2011; Agnihotri *et al.*, 2012; Taspinar *et al.*, 2013; Paul-Samojedny *et al.*, 2014; Chu *et al.*, 2018).

Rovněž byla použita buněčná linie K562 (odvozena od chronické myeloidní leukemie) charakteristická výskytem tzv. Filadelfského chromosomu, která kóduje fúzní *BCR-ABL* tyrosinkinasu [EC 2.7.10.2]. Buňky byly získány od ECACC (European Collection of Cell Cultures) (Kalidas *et al.*, 2001).

Buněčná linie K562/DOX (odvozena od K562 s dlouhodobou kultivací doxorubicinu se zvýšenou expresí P-gp). Buňky K562/DOX měly fenotyp mnohočetné lékové rezistence. V diplomové práci byly použity buněčné linie DOX3_6 (střední exprese P-gp) a DOX1 (vysoká exprese P-gp).

Buňky byly uchovány při -80°C . Po rozmražení probíhala kultivace buněčných linií v RPMI 1640 médiu nebo DMEM s 10% obsahem fetálního hovězího séra (FBS) a s přísadkou penicilinu a streptomycinu ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$). Ke kultivaci byly využity kultivační láhve v inkubátoru s 5% obsahem CO_2 a teplotou 37°C .

3.1.2 Přístrojové zařízení a použité softwary

Chemikálie a vzorky byly váženy na analytické váze ABS 120-4N (KERN, Německo) a chemikálie pro přípravu médií a roztoků byly váženy na digitálních váhách DENVER MXX 612 (Merci, ČR) a míchány na magnetické míchačce RCT basic IKAMAG® (Verkon, ČR). Roztoky, deionizovaná voda a použité materiály byly sterilizovány autoklávkem WOSON, B-class (BMT Medical Technology s.r.o., Brno, ČR). Roztoky byly upravovány pH metrem 3510 (Jenway, Velká Británie). Vzorky byly stáčeny v centrifuze Boeco M-240 (Biotech, Německo), HERMLE Z 326 K (LaborTechnik, Německo) a minicentrifuga blue Lid SE (MTI Corporation, USA). Buněčné linie byly

kultivovány v inkubátoru CellCulture (ESCO, USA) a byly připraveny ve sterilním prostředí ve flowboxu MSC-Advantage (ThermoScientific, USA). Pro stanovení počtu buněk a buněčné viability byl použit Vi-Cell™XR (Beckman Coulter, USA). Vizualizace buněčných linií byla provedena pomocí fluorescenčního mikroskopu s kamerou (XDS-3FL (OPTIKA, USA). Experimenty byly analyzovány na průtokovém cytometru Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, USA) a na hmotnostním detektoru s trojitým kvadrupólem API 3200 (MDS SCIEX, Ontario, Kanada). Vzorky byly vortexovány BioVortex V1 (BioSan, Lotyšsko) a za stálého míchání byla použita třepačka Bio RS-24 (BioSan, Lotyšsko). Vzorky byly vyhřívány v termobloku Bio-TDB 100 (BioSan, Lotyšsko). Koncentrace proteinů a stanovení MTT testu bylo měřeno pomocí spektrofotometru Epoch (BioTek, Nizozemsko). Na elektroforézu byla použita aparatura pro elektroforetickou separaci MiniProtean-3 cell (BioRad, USA) a pro western blott analýzu aparatura TransBlot SD (BioRad, USA). Zdrojem elektrického napětí byl PowerPac HC (BioRad, USA). Denzitometrické kvantitativní vyhodnocení exprese proteinů bylo provedeno pomocí softwaru ImageJ.

3.1.3 Použité chemikálie a roztoky

- 1x phosphate buffered saline (PBS): 130 mmol l⁻¹ NaCl; 10 mmol l⁻¹ NaH₂PO₄; 2,7 mmol l⁻¹ KCl; 1,8 mmol l⁻¹ KH₂PO₄, roztok byl upraven na pH 7,4.
- 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin: Selleckchem, Německo.
- 4% FA (formic acid): Sigma Aldrich, USA.
- DMSO: Duchefa Biochemie, Nizozemsko.
- Geldanamycin: Selleckchem, Německo.
- Kalcein-AM: Sigma Aldrich, USA.
- KO143: Sigma-Aldrich, USA.
- Lomeguatrib: Selleckchem, Německo.
- P/S: 625 mg penicilinu a 1 g streptomycinu bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vodě a sterilně přefiltrováno do falkony.
- Růstové médium (0,5 l): RPMI 1640 a DMEM (Sigma Aldrich USA) + 38 ml FBS (fetální bovinní sérum, Sigma Aldrich, USA) + 5 ml P/S.
- Temozolomid: Selleckchem, Německo.
- Zosuquidar: Tocris, USA.

Stanovení počtu živých a mrtvých buněk

- Trypanová modř: Sigma-Aldrich, USA.

Stanovení buněčné proliferace a viability

- MTT roztok: 5 mg ml⁻¹ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromidu s 0,04 mol l⁻¹ HCl bylo rozpuštěno v 96% (v/v) ethanolu.

Stanovení koncentrace proteinů

- Činidlo Bradfordové (1 l): 50 mg l⁻¹ Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 ml methanolu; 100 ml 85% H₃PO₄ bylo rozpuštěno v 850 ml deionizované vodě.
- Standard: hovězí sérový albumin.

Analýza buněčného cyklu

- Vindalův roztok (100 ml): 20 mg ml⁻¹ RNasa A; 2 mg ml⁻¹ propidium jodid (Invitrogen, USA); 100 μl Triton X-100 (Serva, Německo) bylo doplněno 1x PBS do 100 ml.
- Propidium jodid: 1 μg ml⁻¹ propidium jodidu (Invitrogen, USA); 30% (v/v) glycerinu; 70% (v/v) 1x PBS.

Stanovení intracelulární hladiny léčiva

- Silikonové oleje: Silicone oil AP100 a Silicone oil AR20 v poměru 1:1.
- Extrakční činidlo pro látku GDN a 17-AAG: 600 μl 4% kyseliny mravenčí (w/v).

Analýza exprese P-glykoproteinu

- Protilátka proti receptoru P-gp: myší mAb CD243/P-glykoprotein-PE, klon UIC2, PN IM2370U (Beckman Coulter).

Western blott

- 1x PBS + 0,1% TWEEN20: 100 ml 10x PBS, 1 ml TWEEN20 bylo rozpuštěno v 900 ml deionizované vodě.
- 1x Lyzační pufr (RIPA PUFER): 150 mmol l⁻¹ NaCl (0,876 g), 1% Nonidet P 40 (1 ml), 50 mmol l⁻¹ Tris (0,606 g), 50 mmol l⁻¹ NaF (0,21 g), 5 mmol l⁻¹ EDTA (0,186 g), 5 mmol l⁻¹ pyrofosfát sodný dekahydrát (NAPP) (0,223 g) bylo sterilně rozpuštěno ve 100 ml deionizované vodě a roztok byl upraven na pH 8. Inhibitory proteas a fosfatasy (Roche) byly přidány k pufru zvlášť před použitím ke vzorku.

- 5% blokovací mléko: 5 g sušeného odtučněného mléka bylo rozpuštěno v 100 ml 1x PBS + 0,1% TWEEN20.
- 10% APS: 1 g ammonium persulfate bylo rozpuštěno v 10 ml deionizované vodě.
- 10x Running pufr: 30 g TRIS, 145 g glycinu doplněno do 1 l deionizovanou vodou.
- Blotovací pufr: 100 ml Running pufru, 200 ml methanolu a 700 ml deionizované vody.
- Dělicí gel 4x TRIS/SDS: 1,5 mol l⁻¹ 4x TRIS (45,5 g), 0,4% SDS (1g), 4 ml 36% HCl bylo rozpuštěno v 250 ml deionizované vodě a roztok byl upraven na pH 8,8.
- ECL kit: GE HealthCare (UK).
- Elektrodový pufr: 100 ml Running pufru 10x, 10 ml 10% SDS a roztok byl doplněn deionizovanou vodou do 1 l.
- Laemmliho pufr (6%): 12% SDS (1,44 g), 0,3 mol l⁻¹ TRIS (pH 8,9, 3,6 ml 1 mol l⁻¹ TRIS), 0,3% bromphenolová modř (0,036 g), 60% glycerol (9,16 g = 7,27 ml), 0,75 mol l⁻¹ (1,3878 g) bylo sterilně rozpuštěno ve 12 ml deionizované vodě.
- Primární protilátka: P-glykoprotein (P7965) myší mAb, β-aktin (A2066) králičí mAb (DAKO).
- Standard molekulových hmotností: Spectra Multicolor (Thermo Scientific).
- Ustalovač: G150 (AGFA)
- Vývojka: G354 (AGFA)
- Zaostřovací gel 4x TRIS/SDS: 0,5 mol l⁻¹ 4x TRIS (15,13 g), 0,4% SDS (1 g), 10,5 ml 36% HCl bylo rozpuštěno v 250 ml deionizované vodě a roztok byl upraven na pH 6,8.

3.2 Metody

3.2.1 Určení počtu živých a mrtvých buněk

Počet živých a mrtvých buněk v buněčné suspenzi byl monitorován pomocí přístroje Vi-CELL™XR. Analyzátor hodnotí viabilitu buněk na základě propustnosti cytoplasmatické membrány pro trypanovou modř. Trypanová modř obarví mrtvé buňky, protože barvivo prochází přes porušenou cytoplasmatickou membránu. Živé buňky s neporušenou membránou zůstávají neobarvené. K měření bylo použito 600 μ l buněčné suspenze. Výsledkem analýzy byl počet buněk v mililitru média a vyhodnocení viability v procentech.

3.2.2 Analýza exprese P-glykoproteinu

Buněčná suspenze o přibližné hustotě 2×10^6 buněk/ml byla centrifugována (5 min, 890 g, při laboratorní teplotě). K 50 μ l buněčné suspenze byla přidána fluorescenčně značená protilátka, která je specificky charakteristická proti danému receptoru. Vzorek byl za stálého míchání inkubován 1 h při 4 °C. Následně byla suspenze promyta 1x PBS a sedimentována (5 min, 890 g, při laboratorní teplotě). Ke vzniklému peletu bylo přidáno 500 μ l 1x PBS a měření bylo provedeno na průtokovém cytometru při 488/575 nm. Naměřená exprese receptoru odpovídala obsahu navázané protilátky.

3.2.3 Analýza funkce P-glykoproteinu

K buněčné suspenzi (cca 1×10^5 buněk/ml) byl přidán kalcein acetoxymethyl ester (kalcein-AM), což je substrát pro P-gp ($0,25 \mu\text{mol l}^{-1}$) a inkubace probíhala v inkubátoru po dobu 20 min. Pokud měl vzorek obsahovat inhibitor, tak se k nasazeným buňkám přidal substrát i inhibitor ($0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ZSQ ke kalceinu-AM). Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru při 488/575 nm.

3.2.4 Stanovení intracelulární hladiny geldanamycinu a tanespimycinu

Buněčná suspenze o přibližné hustotě 5 miliónů buněk byla inkubována 3 h s požadovanou koncentrací testované látky v triplicátech. Poté byla buněčná suspenze nanesena na vrstvu silikonového oleje. Vzorek byl centrifugován (15 min, 3880 g, při laboratorní teplotě). Po centrifugaci došlo k oddělení buněk od růstového média. Následně bylo médium s olejem odsáto a stěny zkumavky byly důkladně otřeny do sucha. Poté bylo přidáno extrakční činidlo a inkubace probíhala 10 min na ledu.

Vzorky byly centrifugovány (10 min, 24000 g, při 4 °C) a čistý buněčný extrakt obsahující studované látky byl analyzován pomocí LC-MS/MS.

3.2.5 Stanovení buněčné proliferace a viability

Ke stanovení buněčné proliferace a viability byl proveden standardní MTT test (Mosmann, 1983), který využívá tetrazoliovou sůl [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid; MTT]. Metabolicky aktivní buňky jsou schopné pomocí produktů dehydrogenas redukovat žlutou rozpustnou tetrazoliovou sůl MTT na nerozpustný fialový formazán (krystaly). Formazán se z buněk extrahuje okyseleným ethanolem a vzniklé množství formazánu odpovídá počtu živých buněk. Vyhodnocení se provádí spektroskopicky při vlnové délce 570 nm.

Ke 2 ml buněčné suspenze bylo přidáno 180 µl MTT a inkubace probíhala 45 min při 37 °C. Po 45 min buňky byly centrifugovány (5 min, 1400 g, při laboratorní teplotě). Bylo přidáno 500 µl okyseleného ethanolu na extrakci formazánu a poté probíhala centrifugace (5 min, 24 000 g, při laboratorní teplotě). Vzniklý formazán byl stanoven spektroskopicky při 570 nm.

3.2.6 Buněčná extrakce

Buněčná suspenze byla centrifugována (5 min, 350 g, při laboratorní teplotě), supernatant byl odstraněn. Ke vzniklému sedimentu byly přidány 4 ml studeného 1x PBS a další kroky probíhaly na ledu. Probíhala centrifugace (5 min, 350 g, při 4 °C) a k buňkám bylo napipetováno 180 µl lyzačního pufru RIPA, který obsahoval inhibitory proteas a fosfatas. Následovala 30 min inkubace na ledu za občasného promíchání. Extrakt byl přečištěn centrifugací (10 min, 24000 g, při 4 °C).

3.2.6.1 Stanovení koncentrace proteinů

Množství proteinů bylo měřeno pomocí metody Bradfordové, která využívá barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250. Barvivo se váže na odpovídající množství proteinů a intenzita vzniklého modrého zbarvení se detekuje na spektrofotometru.

K 1 ml činidla Bradfordové bylo přidáno 1 µl přečištěného buněčného extraktu. Směs byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě a vzniklé zbarvení bylo detekováno spektroskopicky při 595 nm. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin.

3.2.6.2 Příprava vzorků, SDS-PAGE, western blott a detekce

Buněčné lyzáty byly naředěny vodou do výsledné koncentrace a byl přidán 4x koncentrovaný Loading buffer. Vzorky byly zvortexovány a denaturovány při 95 °C na 5 min.

Vzorky byly separovány elektroforézou (SDS-PAGE; 80V/120 V) v 7,5% SDS-polyakrylamidovém separačním a 3,5% SDS-zaostřovacím gelu.

Separované proteiny byly přeneseny na nitrocelulázovou membránu (wet blott; 0,15 A na jednu membránu, 30 min). Membrány byly následně blokovány po dobu 1 h v 5% mléku, 1x PBS, 0,1% Tween-20. Membrána byla omyta v 1x PBS 0,1 % Tween-20 (40 min). Na membránu byla nanесena primární monoklonální protilátka ředěná 1:1000 (P-gp), 1:2000 (β-aktin) v blokovacím roztoku a inkubace probíhala přes noc při 4 °C. Následující den byly membrány promývány 1x PBS 0,1 % Tween-20 (40 min). Na membránu byla nanесena sekundární protilátka s konjugovanou křenovou peroxidasou (ředění: myši – 1:10 000; králíci - 1:5 000) (Dako, Dánsko). Inkubace sekundární protilátky ředěná v blokovacím mléku probíhala 1 h při pokojové teplotě. Membrány byly opět promývány 1x PBS 0,1 % Tween-20 (40 min).

Vizualizace byla provedena pomocí chemiluminiscenčního ECL kitu, který obsahoval substrát pro enzym navázaný na sekundární protilátce. Membrány byly inkubovány 5 min ve tmě s chemiluminiscenčním substrátem. Výsledkem byly černé proužky na fotografickém filmu znázorňující jednotlivé proteiny (GE HealthCare). Filmy byly naskenovány pomocí denzitometru.

3.2.7 Stanovení živých buněk pomocí transmembránového mitochondriálního potenciálu

Buňky, které vstupují do apoptosy nebo nekrosy, jsou ovlivněné buď oxidačním stresem, nebo jinými buněčnými procesy, což způsobí depolarizaci mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$). Proapoptotické rodinné proteiny Bcl-2 způsobují permeabilizaci mitochondriální vnější membrány, což vede k uvolnění cytochromu c a k následné aktivaci kaspasy-9 [EC 3.4.22.62] a apoptotické kaskády. Buňky následně vstupují do apoptosy.

Používá se fluorescenční barvivo TMRE (tetramethylrhodaminethylester). Vzniklá fluorescence u aktivních mitochondrií se měří pomocí průtokové cytometrie (excitační maximum 488 nm, emisní maximum 575 nm) za účelem posouzení apoptosy nebo mitochondriální depolarizace. Neapoptotické nebo buňky s polarizovanými

mitochondriemi fluoreskují, zatímco apoptotické buňky nebo buňky s depolarizačními mitochondriemi mají sníženou fluorescenci.

K 1 ml buněčné suspenze byl přidán jeden μl 100 μM TMRE a inkubace probíhala při 37 °C. Po 30 min byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

3.2.8 Analýza buněčného cyklu

Tento postup lze využít ke stanovení relativního zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu na základě množství DNA. Metoda rovněž umožňuje odhadnout počet apoptotických buněk, které mají snížený obsah jaderné DNA (hypodiploidní DNA). Ke stanovení obsahu DNA byl použit průtokový cytometr, který pomocí fluorescenčního barviva (nejčastěji propidium jodid, dále ethidium bromid či DAPI) interkaluje do DNA a vytváří komplexy.

Buněčná suspenze byla centrifugována (5 min, 970 g, při laboratorní teplotě) a supernatant byl odstraněn. Ke vzniklému sedimentu bylo přidáno 450 μl Vindalova roztoku a inkubace probíhala 30 min ve tmě. Vzorek byl změřen na průtokovém cytometru při 488/608 nm a výsledný histogram znázorňuje zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

3.2.9 Stanovení apoptotických buněk

Apoptotické buňky jsou charakterizovány změnou morfologie jader, které vedou k tvorbě apoptotických tělísek. U apoptosy se zmenšuje objem buňky a dochází ke kondenzaci chromatinu.

Buněčná suspenze (1 ml) byla centrifugována (5 min, 970 g, při laboratorní teplotě). Po odstranění supernatantu bylo k peletu přidáno 500 μl 96% ethanolu na fixaci a inkubace probíhala 30 min při -20 °C. Následně probíhala centrifugace (5 min, 970 g, při laboratorní teplotě), k peletu se přidal propidium jodid. Změna morfologie jader byla pozorována pomocí fluorescenčního mikroskopu.

4 VÝSLEDKY

4.1 Účinnost léčby glioblastomu

U nádoru GBM se používá kombinovaná léčba tzn. radikální chirurgická resekce, radioterapie a chemoterapie (TMZ). Medián přežití je v současné době u neléčených pacientů tři měsíce, u léčených jeden rok (Krex *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2011). Příčin selhání je spousta, hlavní jsou genetické alterace nádorů. Řada mutací způsobuje, že je nádor rezistentní vůči chemoterapeutikům. TMZ je hlavním chemoterapeutikem, který se používá, nicméně jeho účinnost není velká. Důvodem obtížností léčby je to, že nádor je geneticky heterogenní, je nositelem celé řady různých mutací, např. *MGMT*, *TP53*, *PTEN*, *EGFR*, isocitrát dehydrogenasa (*IDH1/2*) [EC 1.1.1.42] a ztráta heterozigosity u chromosomu 10q. Některé mutace jsou důležitým prognostickým faktorem u GBM a také se využívají jako nový směr v cílené terapii (Karsy *et al.*, 2015).

Inhibice angiogeneze byla významným molekulárním cílem. Je používán lék bevacizumab. Je to monoklonální protilátka proti VEGF. Byl testován ve III. fázi klinických zkoušek, ale ukázalo se, že pouze zpomaluje růst nádoru (Mamo *et al.*, 2016). Za slibný lék v léčbě recidivujícího GBM byla považována kombinace bevacizumabu s irinotecanem (inhibuje topoisomerasu I) (Peters *et al.*, 2015).

Mutace *EGFR* se vyskytuje přibližně u 20-30 % všech GBM (Sugawa *et al.*, 1990; Frederick *et al.*, 2000). K léčbě se používají tyrosinkinasové inhibitory (s gefitinibem, erlotinibem či imatinibem). Nicméně aplikace léčiva u pacientů, kteří mají danou mutaci *EGFR*, výsledek není uspokojivý. Žádná studie nepotvrdila zlepšení léčby GBM oproti současné léčbě (Peereboom *et al.*, 2010). Cetuximab (inhibitor *EGFR*) byl dobře snášen u pacientů v I. a II. fázi klinického testování, ale ukázal se pouze mírný efekt v léčbě GBM (Neyns *et al.*, 2009; Hasselbalch *et al.*, 2010).

Zkoumaným je také inhibitor everolimus mTOR. Dráha má důležitou roli v metabolismu, buněčné proliferaci a angiogenezi. Zvýšená aktivita mTOR je způsobena mutací *PTEN* či amplifikací *EGFR*, dochází k rozvoji nádoru. Mutace genu *PTEN* se vyskytuje přibližně u 25 % GBM (Kato *et al.*, 2000). Everolimus (derivát rapamycinu) vytváří komplex s intracelulárním proteinem FKBP-12, inhibuje mTOR serinthreoninovou kinasu, ale aplikace nepřinesla žádný efekt (Mecca *et al.*, 2018).

Zkoumaným inhibítozem byl také cilengitid (antagonista integrinu), váže se na buněčné receptory, a tím inhibuje růst nádoru a angiogenezi. Cilengitid vykazoval slibné výsledky pouze u pacientů s metylovaným promotorem *MGMT* (Stupp *et al.*, 2014).

Zvýšený účinek TMZ byl zkoumán v přítomnosti β -asaronu. β -asaron má antikarcinogenní účinky a usnadňuje vstup TMZ do buněk přes HEB. *In vitro* testech β -asaron s TMZ inhibuje expresi P-gp, což způsobí zpomalení růstu nádoru (Wang *et al.*, 2017).

Ani cílená terapie nevede, jak je výše uvedeno k podstatnému zlepšení léčby. Proto se stále hledají nové cesty. Hledají se proto léčiva, která by měla obecnější účinnost na všechny nádory a nebyla by závislá na dílčích mutacích. Problémem je, že mozková tkáň je od krevního řečiště oddělena HEB. Léčiva by měla částečně procházet HEB. Jako jednu z alternativ jsme zvolili inhibitory HSP90 GDN a jeho derivátu 17-AAG. Tyto látky byly vybrány, protože většina nádorů je na HSPs závislá. GDN je modelová látka, ale v klinické praxi se nevyužívá kvůli cytotoxicitě. V klinických testech se proto používá derivát 17-AAG.

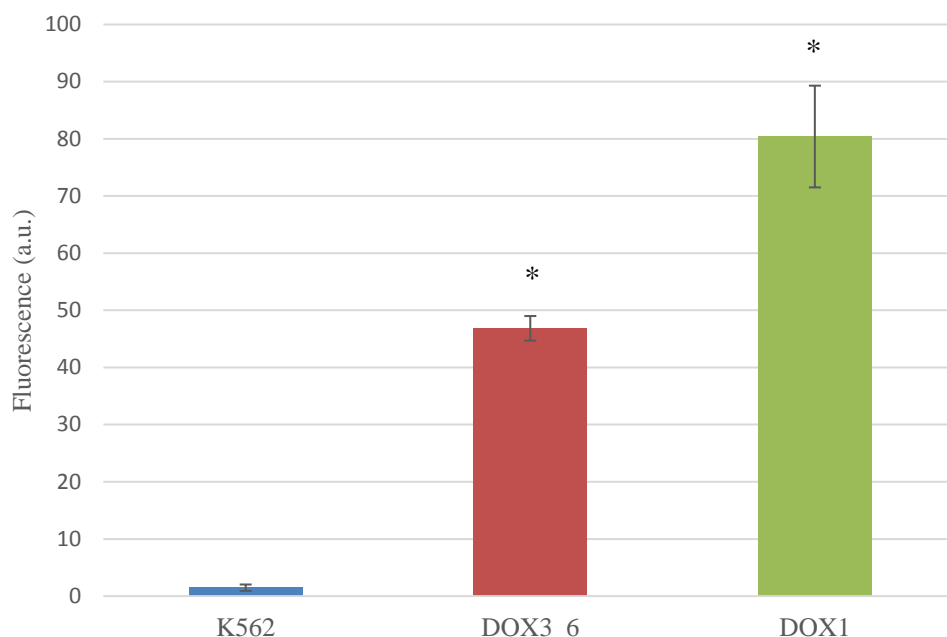
4.2 Účinnost vzhledem k expresi *ABCB1*

Testovali jsme látky GDN a 17-AAG s buňkami exprimující různou úroveň P-gp. Vybrali jsme buněčné linie DOX3_6 a DOX1.

4.2.1 Charakteristika rezistentních buněk

4.2.1.1 Analýza exprese P-glykoproteinu

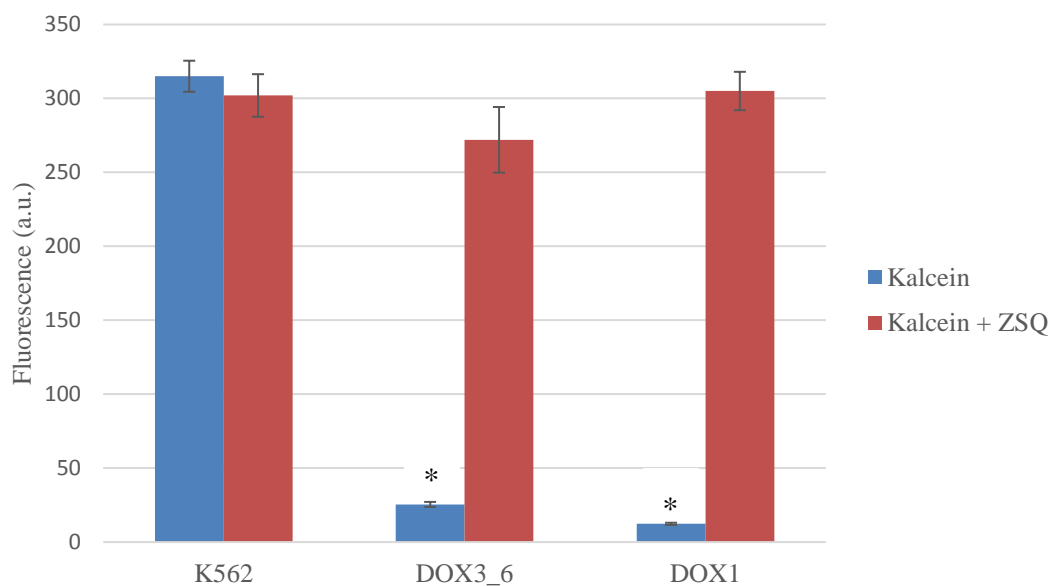
K buněčným liniím byla přidána fluorescenčně značená protilátka receptoru P-gp. Po 1 h inkubaci byla provedena analýza exprese P-gp, vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru. Jako pozitivní kontrola byla použita buněčná linie se zvýšenou expresí P-gp (DOX3_6 a DOX1). Výsledek měření exprese P-gp je znázorněn na Obr. 12. Nejvyšší exprese *ABCB1* genu byla naměřena u buněk DOX1. Tato exprese byla 54 krát vyšší, než v kontrolní buněčné linii K562. Buňky DOX3_6 mají 32 násobně vyšší expresi ve srovnání s K562. Buněčná linie K562 neexprimuje *ABCB1* transportér.



Obr. 12 Analýza exprese P-gp u buněk K562, DOX3_6 a DOX1. K buněčné suspenzi byla přidána fluorescenčně značená protilátka CD243/P-glykoprotein-PE. Vyhodnocení bylo provedeno na průtokovém cytometru. Výsledky byly získány ze 3 měření se směrodatnou odchylkou. * - statisticky významný rozdíl v expresi P-gp mezi buňkami K562 a DOX3_6/DOX1 ($P < 0,05$).

4.2.1.2 Stanovení funkce P-glykoproteínu

Pro stanovení funkce P-gp byly použity buněčné linie K562 (kontrola), DOX3_6 (střední exprese P-gp) a DOX1 (vysoká exprese P-gp). P-gp je schopný transportovat kalcein-AM (substrát). U buněk s nejvyšší expresí P-gp (DOX1) byla naměřena nejnižší fluorescence kalceinu. Bylo porovnáno, zda po přidání inhibitoru ($0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ZSQ) k substrátu se zvýší fluorescence kalceinu u buněčných linií s expresí P-gp. Z Obr. 13 bylo zjištěno, že získána rezistence je způsobena ABCB1 transportérem. Po přidání inhibitoru ZSQ se zvýšila fluorescence kalceinu u buněk se zvýšenou expresí P-gp.

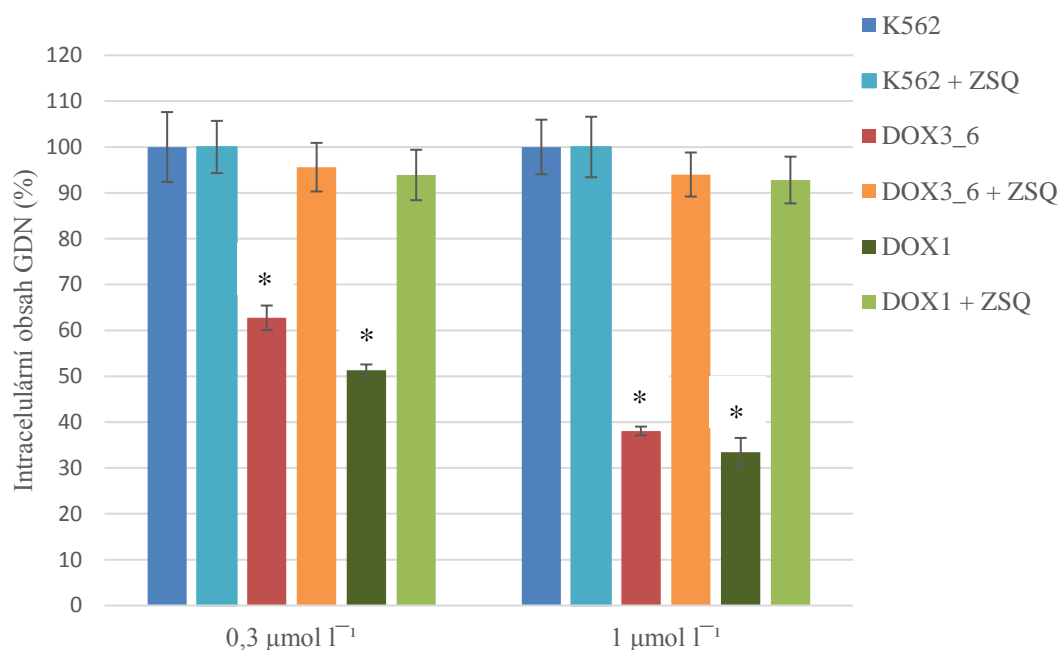


Obr. 13 Stanovení funkce P-gp u buněk K562, DOX3-6 a DOX1. K buněčné suspenzi byl přidán kalcein acetoxyethyl ester ($0,25 \mu\text{mol l}^{-1}$ kalcein-AM) substrát pro P-gp. K buňkám, inkubované s kalceinem-AM, byl také přidán inhibitor zosuquidar (ZSQ; $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$). Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru. Výsledky jsou získány ze 3 měření se směrodatnou odchylkou. * - statisticky významný rozdíl po působení kalceinu-AM mezi buňkami K562 a DOX3_6/DOX1 ($P < 0,05$).

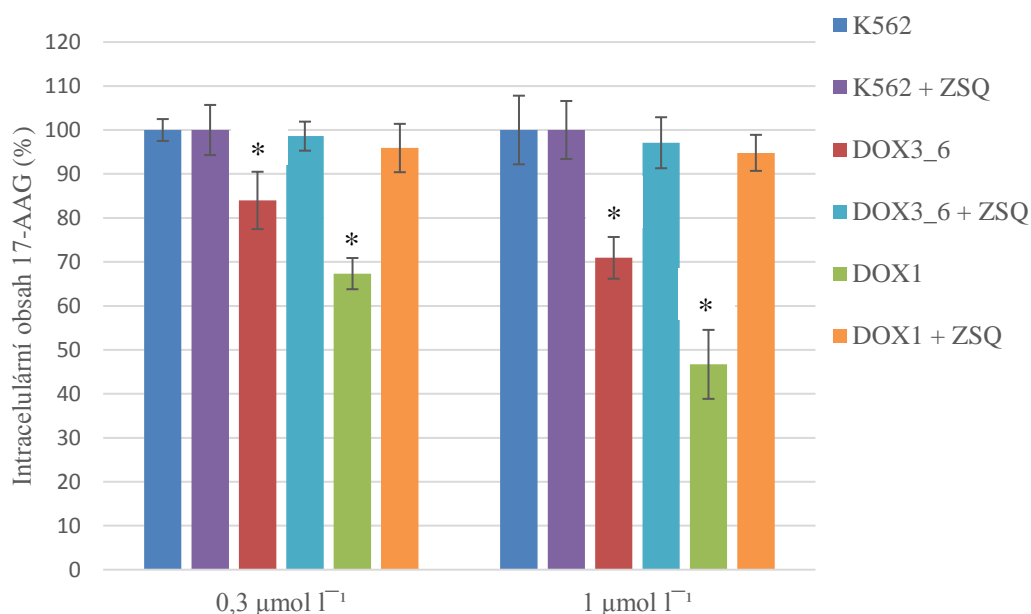
4.2.1.3 Intracelulární hladina geldanamycinu a tanespimycinu u rezistentních buněk

LC-MS/MS je vysoce citlivá, specifická metoda, využívá se pro stanovení protinádorových léčiv. Tato metoda se používá pro stanovení intracelulárního obsahu GDN a 17-AAG u buněk K562 a u buněk se zvýšenou expresí P-gp DOX3_6 a DOX1. Buňky byly inkubovány s GDN a 17-AAG o koncentracích $0,3$ a $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ 3 h při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Bylo potvrzeno, že GDN je transportován s vyšší účinností vzhledem k derivátu 17-AAG (Obr. 14). Po aplikaci inhibitoru ZSQ ($0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$) k rezistentním buňkám, došlo ke zvýšení intracelulární hladiny GDN a 17-AAG.

a)



b)



Obr. 14 Vliv geldanamycinu (GDN; a) tanespimycinu (17-AAG; b) na účinnost vzhledem k expresi *ABCB1* u buněčných liniích K562, DOX3_6 a DOX1. Buňky byly inkubovány 3 h ve standardním růstovém médiu v přítomnosti GDN nebo 17-AAG (0,3 a 1 μmol l⁻¹) a v přítomnosti inhibitoru P-gp (0,1 μmol l⁻¹ ZSQ). Po inkubaci byl GDN nebo 17-AAG extrahován 600 μl extrakčního roztoku 4% (w/v) FA + 40% (v/v) MeOH/voda a analyzován pomocí LC-MS/MS. Zobrazená data byla získána ze 3 měření a uvedeny se směrodatnou odchylkou. * - statisticky významný rozdíl po působení látky GDN a 17-AAG mezi buňkami K562 a DOX3_6/DOX1 (P<0,05).

4.2.1.4 Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na citlivost rezistentních buněčných linií

K zjištění rozdílů cytotoxicity GDN a 17-AAG byl použit MTT test. Standardní MTT test vyhodnocuje jak buněčnou proliferaci, tak indukci apoptosy. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu s přítomností GDN a 17-AAG (100, 300, 1000, 3000 nmol l⁻¹). Cytotoxické účinky látek byly po 120 h vyhodnoceny. Kontrolní buněčnou linií byla K562. K buňkám byl přidán inhibitor ZSQ, který povrdil, že získána rezistence je způsobena ABCB1 transportérem. Výsledkem bylo potvrzeno, že vyšší cytotoxický účinek má derivát 17-AAG (Tab. 2).

Tab. 2 Cytotoxické účinky geldanamycinu a tanespimycinu vyjádřené jako hodnoty IC₅₀ vypočtené z MTT testu.

Buňky	Geldanamycin IC ₅₀ (nmol l ⁻¹)	Tanespimycin IC ₅₀ (nmol l ⁻¹)
K562	122,4 ± 18,4	48,5 ± 7,3
K562 + ZSQ	128,6 ± 20,4	51,4 ± 8,9
DOX3_6	1246,3 ± 188,9	714,2 ± 104,1
DOX3_6 + ZSQ	160,8 ± 24,5	63,4 ± 10,2
DOX1	2950,3 ± 455,5	1950,2 ± 305,7
DOX + ZSQ	175,84 ± 27,8	68,1 ± 13,2

Zobrazená data byla získána z 6 měření a uvedeny se směrodatnou odchylkou. ZSQ - 0,1 μmol l⁻¹ zosuquidar.

4.3 Charakteristika nádorových buněk multiforního glioblastomu

Pro tuto studii byly použité tři glioblastomové buněčné linie s rozdílnou genetickou variabilitou. V Tab. 3 byl u každé linie popsán histologický původ a mutace genů. Informace o mutacích byly získány z literatury (American Type Culture Collection, 13. 4. 2019; Paul-Samojedny *et al.*, 2014).

Tab. 3 Panel s nádorovými buňkami multiformního glioblastomu. Každá buněčná linie obsahuje histologický původ a status genu (American Type Culture Collection, 13. 4. 2019; Paul-Samojedny *et al.*, 2014).

Název	ATCC® No.	Histologie	Status genu
U-87 MG	HTB-14	glioblastom, astrocytom	<i>ABCBI</i> - neexprimovaný <i>CDKN2A</i> - mutace <i>CDKN2C</i> - mutace <i>MGMT</i> - snížená exprese <i>PTEN</i> - mutace <i>TP53</i> - WT
T98G	CRL-1690	multiformní glioblastom	<i>ABCBI</i> - neexprimovaný <i>CDKN2A</i> - mutace <i>CDKN2C</i> - WT <i>MGMT</i> - zvýšená exprese <i>PTEN</i> - WT <i>TP53</i> - mutace
H4	HTB-148	neuroglioma	<i>ABCBI</i> - zvýšená exprese <i>CDKN2A</i> - mutace <i>CDKN2C</i> - WT <i>MGMT</i> - zvýšená exprese <i>PTEN</i> - mutace <i>TP53</i> - WT

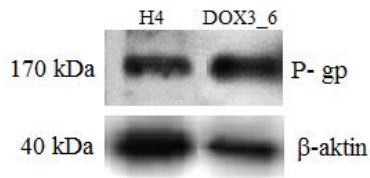
WT – z angl. Wild type (divoký typ)

4.4 Charakteristika buněčné linie H4

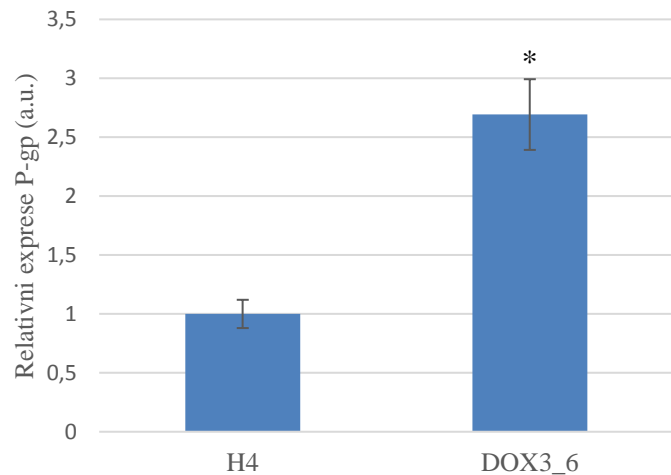
4.4.1 Analýza exprese P-glykoproteinu

Pomocí western blottu byla ověřena exprese P-gp u buněčné linie H4. Výsledky ukázaly, že H4 má zvýšenou expresi P-gp. Buňky H4 mají nižší expresi P-gp než buňky DOX3_6. Buněčná linie DOX3_6 má střední expresi P-gp (Obr. 15).

a)



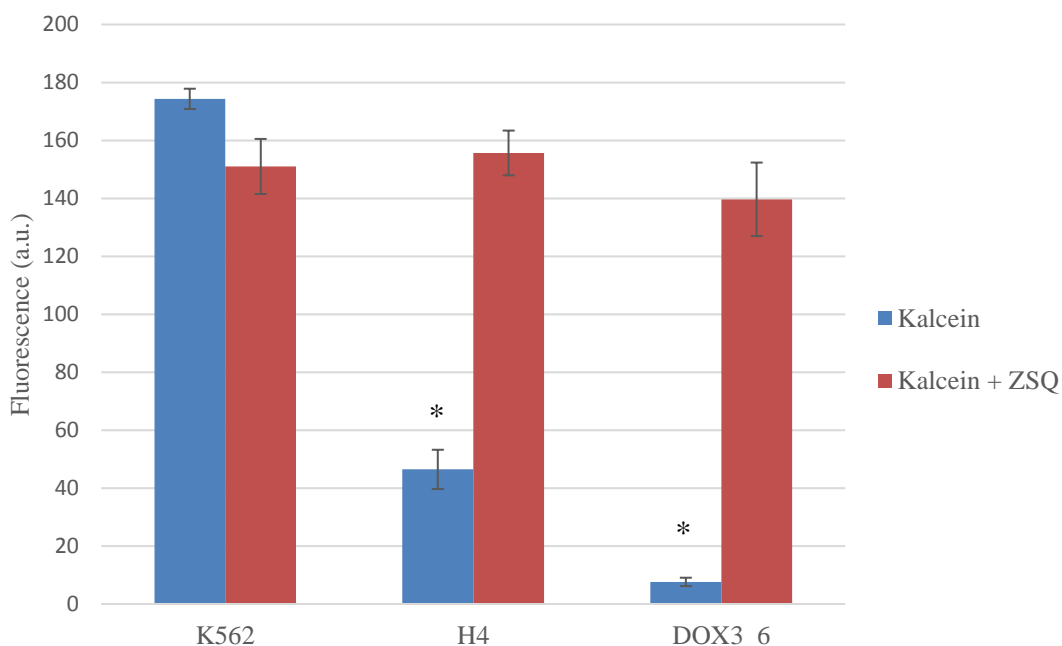
b)



Obr. 15 Typický výsledek P-gp z western blotu (a). Denzitometrické kvantitativní hodnocení exprese P-gp pomocí myši monoklonální protilátky u buněk H4 a DOX3_6 (střední exprese P-gp) (b). Jako referenční protein byl použit β -aktin. U exprese P-gp buňky H4 byla přidělena hodnota 1. Denzitometrické kvantitativní hodnocení exprese proteinů bylo provedeno pomocí programu ImageJ. Střední chyba průměru byla vypočítána ze 3 replikátů. * - statisticky významný rozdíl v expresi P-gp mezi buňkami H4 a DOX3_6 ($P < 0,05$).

4.4.2 Stanovení funkce P-glykoproteinu

U buněčné linie H4 byla potvrzena zvýšená exprese P-gp. Substrát pro P-gp byl kalcein-AM. U buněk H4 byla pozorována snížená fluorescence kalceinu. U buněčné linie DOX3_6 byla fluorescence kalceinu nejnižší, protože buňky mají střední expresi P-gp. Po přidání inhibitoru ZSQ ($0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$) byla fluorescence srovnatelná s kontrolní buněčnou linií K562 (Obr. 16).



Obr. 16 Stanovení funkce P-gp u buněk K562, H4 a DOX3_6. K buněčné suspenzi byl přidán kalcein acetoxyethyl ester ($0,25 \mu\text{mol l}^{-1}$ kalcein-AM) substrát pro P-gp. K buňkám, inkubované s kalceinem-AM, byl také přidán inhibitor zosuquidar (ZSQ; $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$). Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru. Výsledky jsou získány ze 3 měření se směrodatnou odchylkou. * - statisticky významný rozdíl po přidání kalceinu-AM mezi buňkami K562 a H4/DOX3_6 ($P < 0,05$).

4.5 Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na proliferaci a viabilitu u buněk glioblastomu

Testovaly se dva inhibitory HSPs GDN a jeho derivát 17-AAG na třech buněčných liniích T98G, U87 a H4 po dobu pěti dní. Pro srovnání byl pozorován vliv používaného léčiva TMZ a inhibitoru LMB. Ke stanovení buněčné proliferace a viability byl použit standardní MTT test. Buněčné linie T98G a U87 neexprimovaly žádný lékový transportér, nicméně H4 exprimovala ABCB1 transportér. Proto u buněčné linie H4 byl přidán inhibitor $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ZSQ. Podle očekávání naše výsledky ukázaly u všech liniích, že GDN a 17-AAG měly mnohem vyšší cytotoxický účinek, přičemž derivát 17-AAG byl ještě silnější než GDN (Tab. 4). U všech buněčných liniích ošetřených TMZ, LMB a jejich kombinací nebyl pozorován výrazný efekt. U buněčné linie H4 byla naměřena nejvyšší hodnota IC_{50} GDN a 17-AAG z důvodu zvýšené exprese *ABCB1*. Po přidání inhibitoru ZSQ došlo ke zvýšení cytotoxického účinku. Rozdíl cytotoxického účinku GDN u všech buněčných linií byl v tom, že GDN je transportován s vyšší účinností oproti 17-AAG.

Tab. 4 Cytotoxické účinky GDN, 17-AAG, TMZ, LMB a TMZ + LMB vyjádřené jako hodnoty IC_{50} vypočtené z MTT testu.

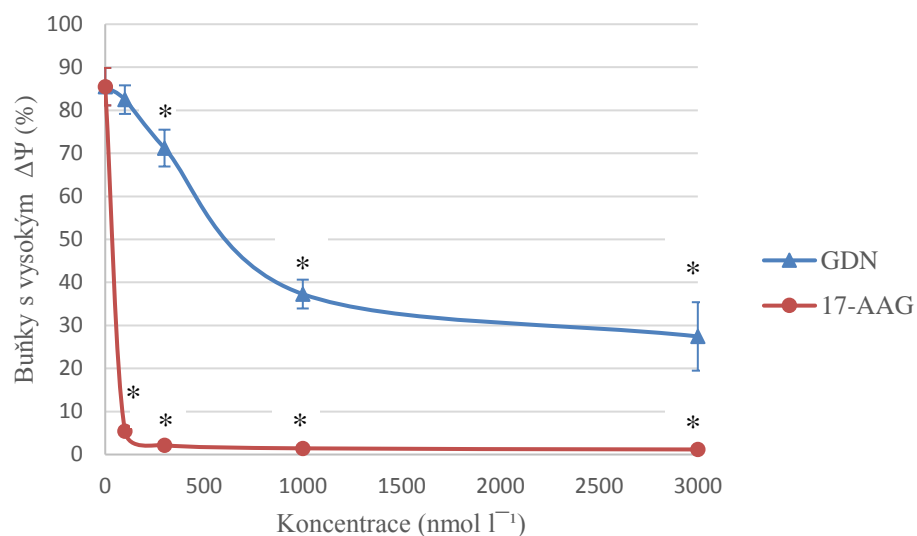
Buňky	Geldanamycin IC_{50} (nmol l ⁻¹)	Tanespimycin IC_{50} (nmol l ⁻¹)	Temozolomid IC_{50} (μmol l ⁻¹)	Lomeguatrib IC_{50} (μmol l ⁻¹)	Temozolomid Lomeguatrib IC_{50} (μmol l ⁻¹)
T98G	151,8 ± 23,7	24,1 ± 3,2	>10	>10	>10
U87	66,0 ± 8,9	20,3 ± 2,8	>10	>10	>10
H4	626,2 ± 98,5	26,2 ± 3,9	>10	>10	>10
H4 + ZSQ	57,2 ± 9,6	4,5 ± 0,7	>10	>10	>10

Zobrazená data byla získána z 6 měření a uvedeny se směrodatnou odchylkou. ZSQ - 0,1 μmol l⁻¹ zosuquidar.

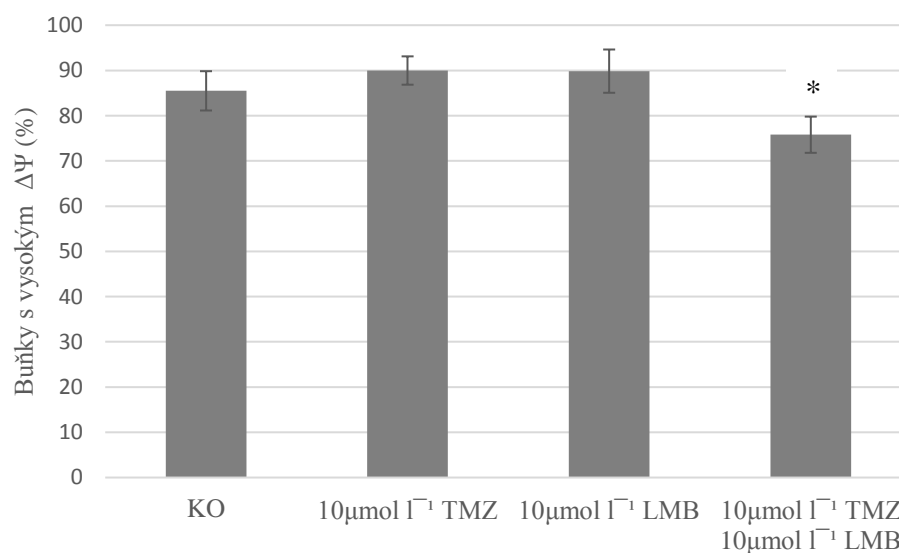
4.6 Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na analýzu transmembránového potenciálu u buněk glioblastomu

Předcházející výsledky z MTT testu ukázaly změny v proliferaci a viabilitě. Výsledek je přesto nedostačující, protože test nedokáže upřesnit, jestli došlo k samotnému poklesu proliferace či viabilitě, nebo jestli došlo současně ke dvěma jevům. Proto byla využita další metoda transmembránového mitochondriálního potenciálu, která zjistila počet mrtvých a živých buněk. Analýza využívá fluorescenční barvivo TMRE. Fluorescence aktivních mitochondrií byla naměřena na průtokovém cytometru u buněčných linií T98G, U87 a H4. Působení TMZ, LMB oproti GDN a 17-AAG vykazoval mírný účinek u buněk T98G a H4. Buněčná linie U87 má sníženou expresi *MGMT*, proto byly buňky citlivější k TMZ. Výsledky dokázaly, že nejúčinnější látkou byl derivát 17-AAG u všech buněčných liniích (Obr. 17, 18 a 19).

a)

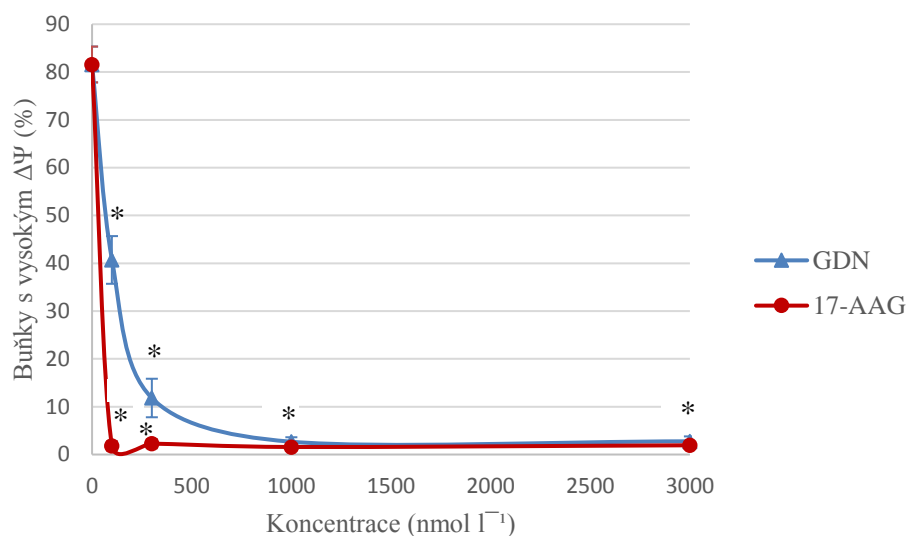


b)

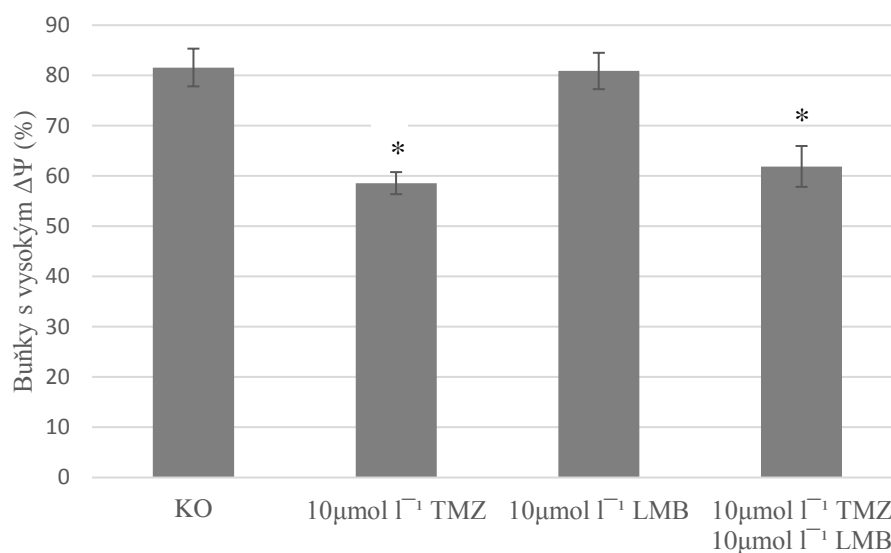


Obr. 17 Analýza transmembránového potenciálu u buněk T98G po inkubaci s GDN, 17-AAG, TMZ a LMB. Buňky byly kultivovány 120 h při 37 °C ve standardním růstovém médiu s látkami GDN, 17-AAG, léčivy TMZ, LMB a měřeny na průtokovém cytometru. Buňky T98G inkubované s GDN a 17-AAG (100, 300, 1000, 3000 nmol l⁻¹) (a), buňky s přidavkem 10 μmol l⁻¹ TMZ, LMB nebo kombinací obou léčiv (b). Střední chyba průměru byla vypočítána z 6 replikátů. * - statisticky významný rozdíl u buněčné linie T98G neovlivněné chemoterapeutiky a po působení látek GDN, 17-AAG, léčiv TMZ a LMB (P<0,05). 17-AAG – tanespimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid.

a)

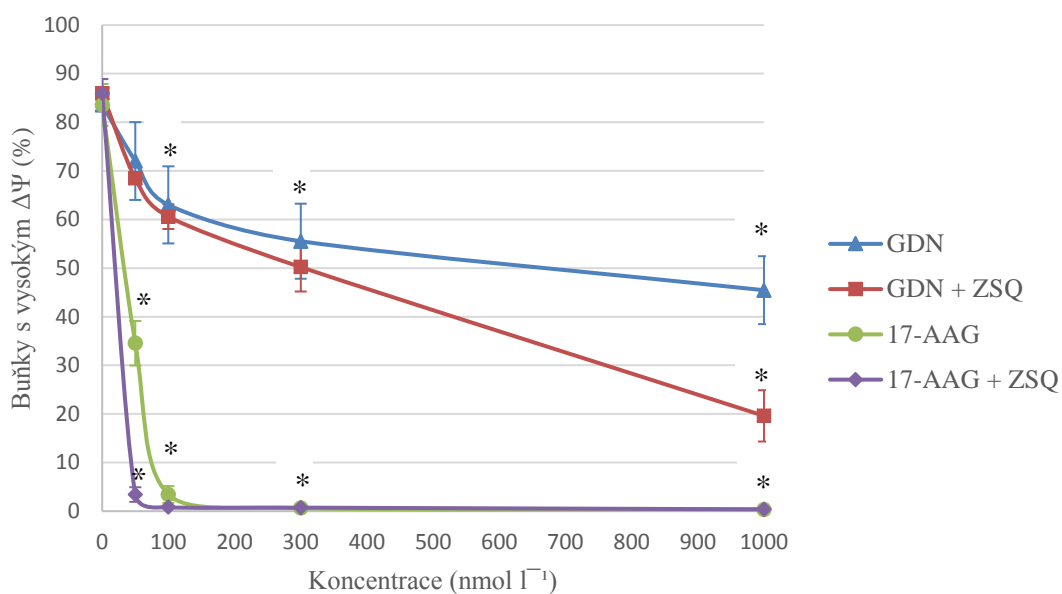


b)

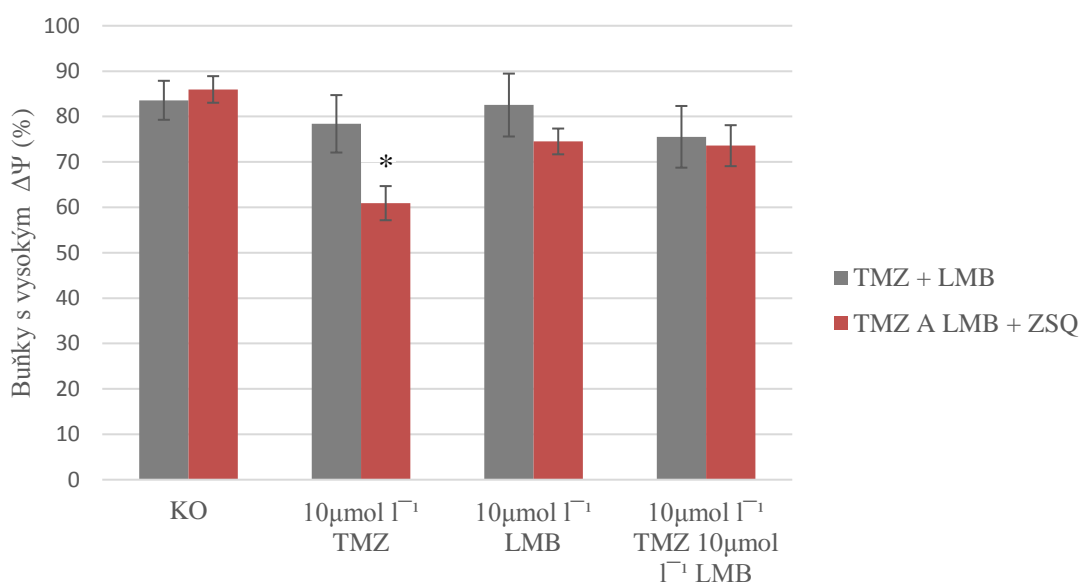


Obr. 18 Analýza transmembránového potenciálu u buněk U87 po inkubaci s GDN, 17-AAG, TMZ a LMB. Buňky byly kultivovány 120 h při 37 °C ve standardním růstovém médiu a měřeny na průtokovém cytometru. U87 inkubované s GDN a 17-AAG (100, 300, 1000, 3000 nmol l⁻¹) (a), buňky s přidavkem 10 μmol l⁻¹ TMZ, LMB nebo kombinací obou léčiv (b). Střední chyba průměru byla vypočítána z 6 replikátů. * - statisticky významný rozdíl u buněčné linie U87 neovlivněné chemoterapeutiky a po působení látek GDN, 17-AAG, léčiv TMZ a LMB (P<0,05). 17-AAG – tanespimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid.

a)



b)



Obr. 19 Analýza transmembránového potenciálu u buněk H4 po inkubaci s GDN, 17-AAG, TMZ, LMB a v přítomnosti inhibitoru P-gp (0,1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ZSQ). Buňky byly kultivovány 120 h při 37 °C ve standardním růstovém médiu a měřeny na průtokovém cytometru. H4 inkubované s GDN a 17-AAG (50, 100, 300, 1000 nmol l⁻¹) (a), buňky s přidavkem 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ TMZ, LMB nebo kombinací obou léčiv (b). Střední chyba průměru byla vypočítána z 6 replikátů. * - statisticky významný rozdíl u buněčné linie H4 neovlivněné chemoterapeutiky a po působení látek GDN, 17-AAG, léčiv TMZ a LMB (P < 0,05). 17-AAG – tansespimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid, ZSQ – zosuquidar.

4.7 Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na buněčný cyklus a indukci apoptozy u buněk glioblastomu

Analýza buněčného cyklu byla provedena na průtokovém cytometru. Byly použity tři buněčné linie T98G, U87 a H4 inkubovaných s GDN a 17-AAG ve srovnání s TMZ a LMB. Typické histogramy ukazuje Obr. 20, 21 a 22. Výsledkem analýzy byly graficky, číselně vyznačené apoptotické buňky, rozložení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. První pík je charakteristický pro G₁ fázi, následuje S fáze a druhý pík značí G₂/M fázi. Byl zjištěn výrazně menší počet apoptotických buněk než u analýzy membránového mitochondriálního potenciálu, který zjistil vysoký počet mrtvých buněk.

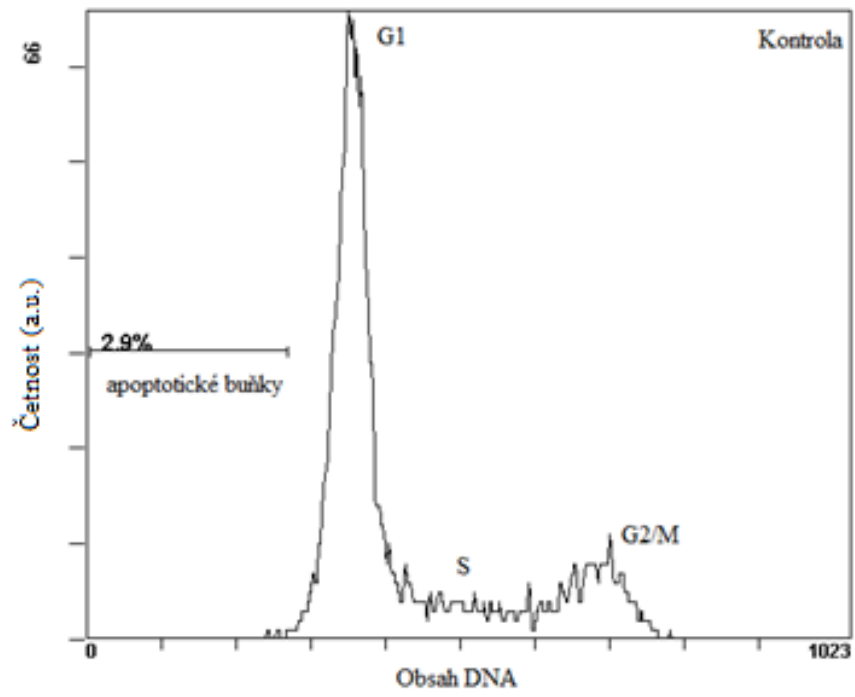
Průměrné množství apoptotických buněk ukazuje Obr. 23, 24 a 25. Apoptosa byla pozorována v subpopulaci buněk v G₁ fázi. Výsledek TMZ v kombinaci s LMB způsobil i při vysoké koncentraci 10 μmol l⁻¹ velmi malý apoptotický efekt. GDN měl vyšší apoptotický efekt než TMZ s LMB. Zatímco derivát 17-AAG způsobil velký apoptotický efekt už při nanomolární koncentraci. Přestože je zjištěna exprese P-gp u buněčné linie H4, rozdíl mezi indukcí apoptozy u buněk H4 a H4 s ZSQ byl malý. Rozdíl v účinnosti GDN a derivátu 17-AAG byl malý.

Analýzou buněčného cyklu (Obr. 26) u buněk T98G nebyl sledován žádný efekt. Přídavek TMZ nezpůsobil změny v buněčném cyklu, protože měl zvýšenou expresi *MGMT*, mutaci *TP53* a *CDKN2*. Po působení GDN, 17-AAG, TMZ a TMZ v kombinaci s LMB nebyly pozorovány signifikantní rozdíly oproti kontrole.

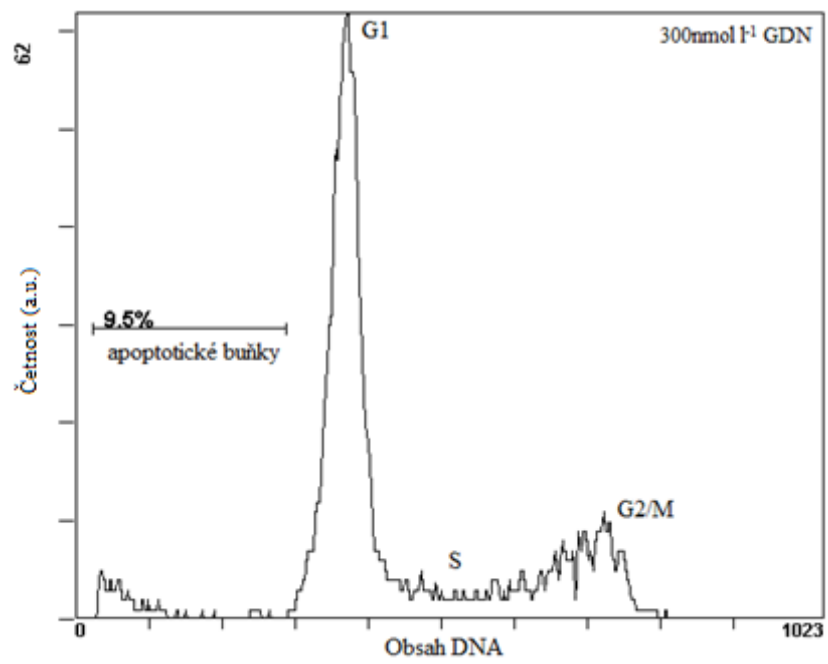
U buněčné linie U87 byl pozorován blok v G₂/M fázi s výjimkou LMB. U87 měla sníženou expresi *MGMT*, proto TMZ a jeho kombinace s LMB měla vliv na změnu buněčného cyklu. Zmíněný efekt byl také pozorován u buněk inkubovaných s GDN a 17-AAG. Způsobená akumulace buněk v G₂/M fázi měla za následek snížení buněk v G₀/G₁ a byl pozorován nárůst v S fázi.

U buněk H4 a H4 se ZSQ nebyly signifikantní rozdíly mezi výsledky. Léčiva TMZ, LMB a jejich kombinace neměla žádný efekt, z důvodu vysoké exprese *MGMT*. Buňky H4 měly neexprimovaný *TP53* gen. U buněčné linie nebyly pozorovány žádné změny, kvůli zvýšené expresi *ABCBI*. Po použití inhibitoru ZSQ nebyl zaznamenán žádný efekt.

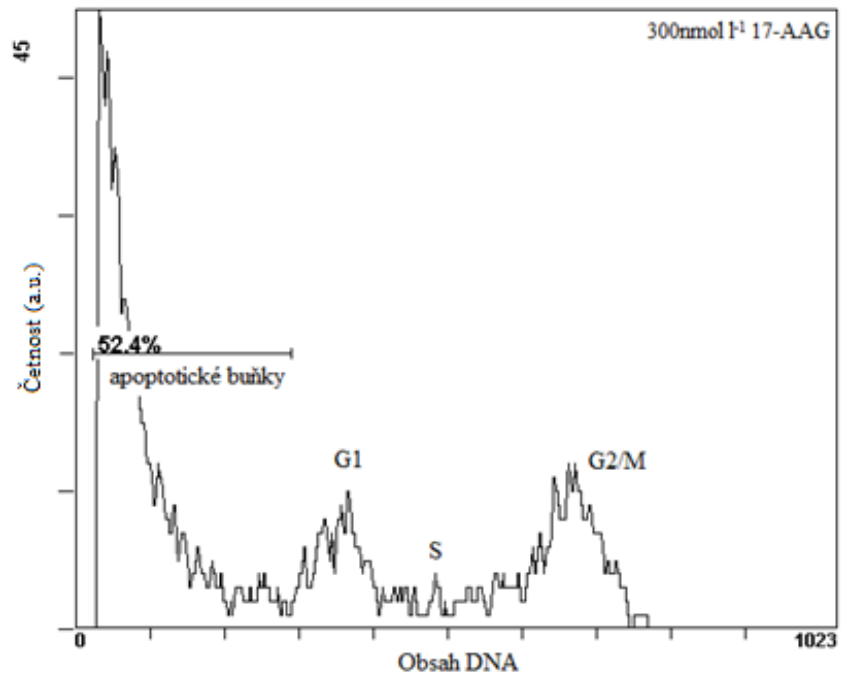
a)



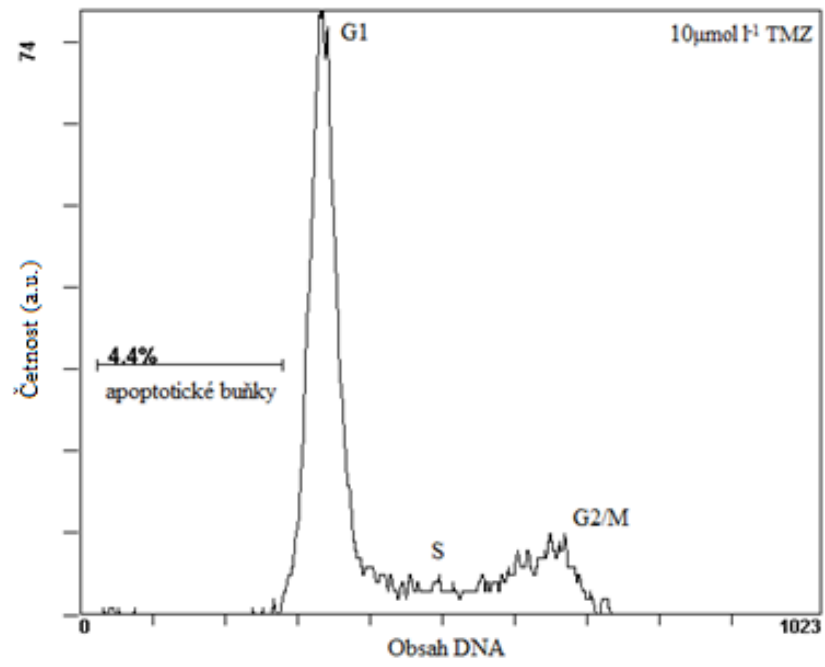
b)



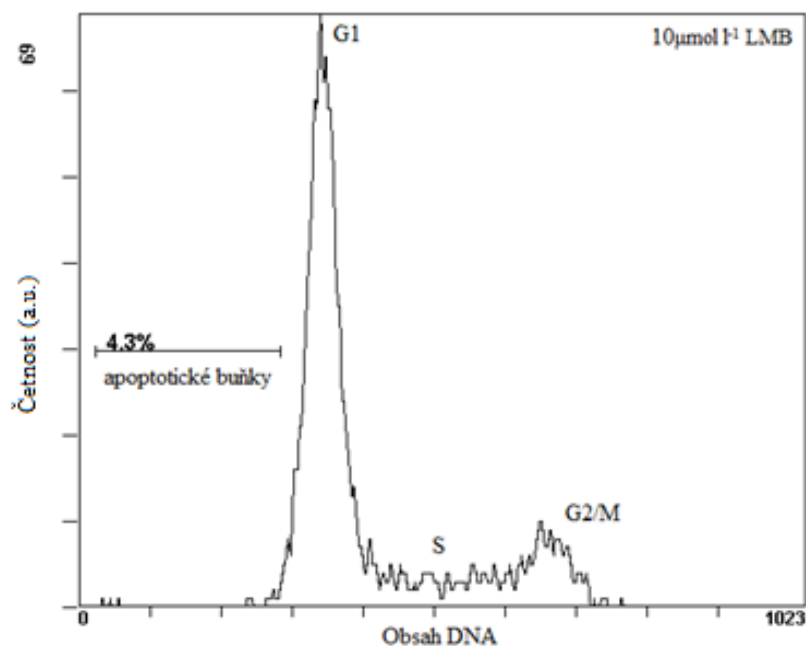
c)



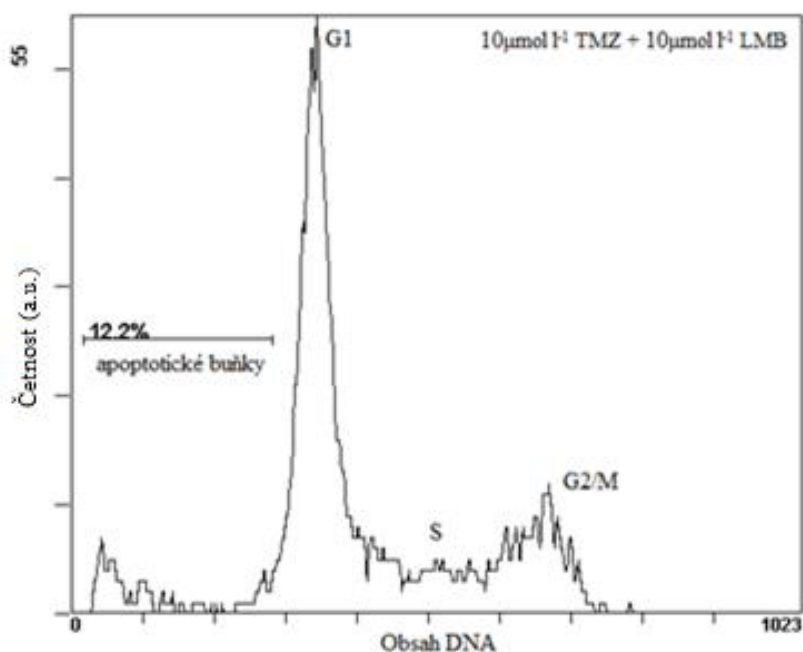
d)



e)

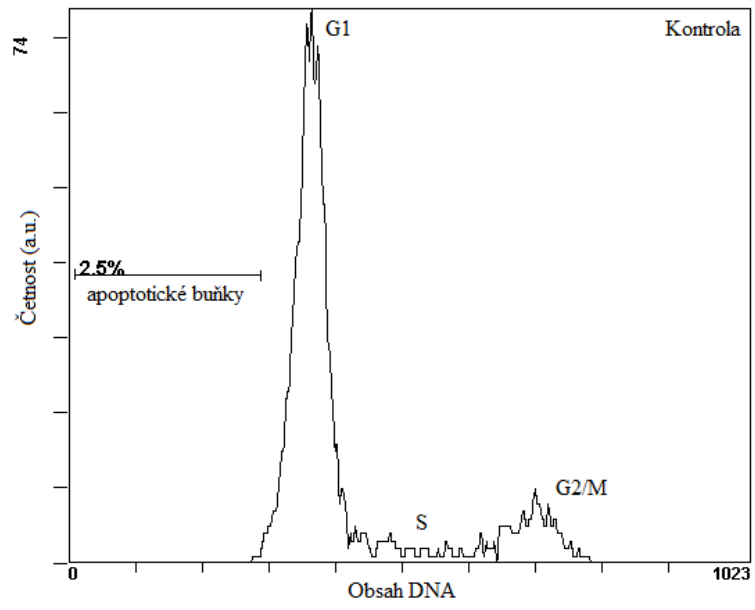


f)

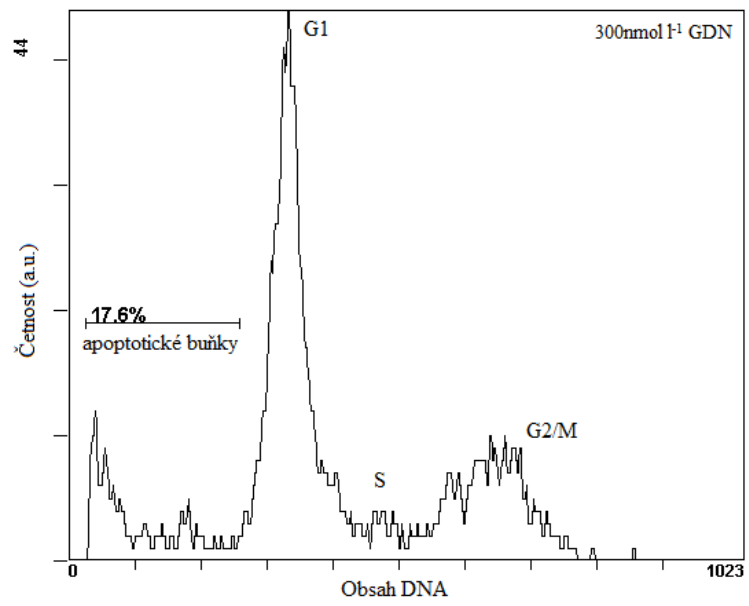


Obr. 20 Analýza buněčného cyklu u buněk T98G inkubovaných s GDN, 17-AAG, TMZ a LMB. Buňky T98G byly kultivovány 120 h při 37 °C ve standardním růstovém médiu, obarveny propidium jodidem a měřeny na průtokovém cytometru. Kontrolní buňky T98G (a), buňky T98G s přidavkem 300 nmol l⁻¹ GDN (b), 300 nmol l⁻¹ 17-AAG (c), 10 μmol l⁻¹ TMZ (d), 10 μmol l⁻¹ LMB (e), 10 μmol l⁻¹ TMZ + LMB (f). Na histogramu byla číselně zobrazena četnost apoptotických buněk. Na ose x byla zobrazena intenzita naměřené fluorescence propidium jodidu, odpovídající množství DNA v jádře. Na ose y byla relativní četnost buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. 17-AAG – tanespicimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid.

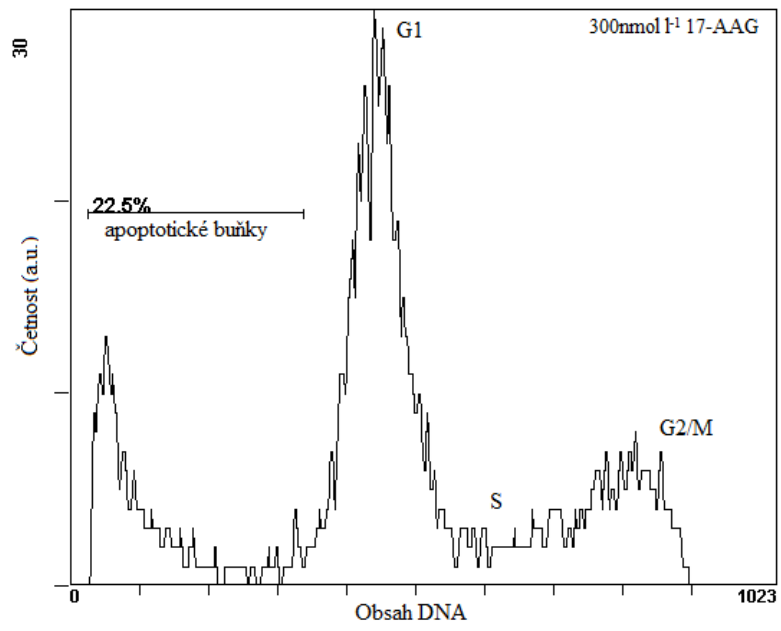
a)



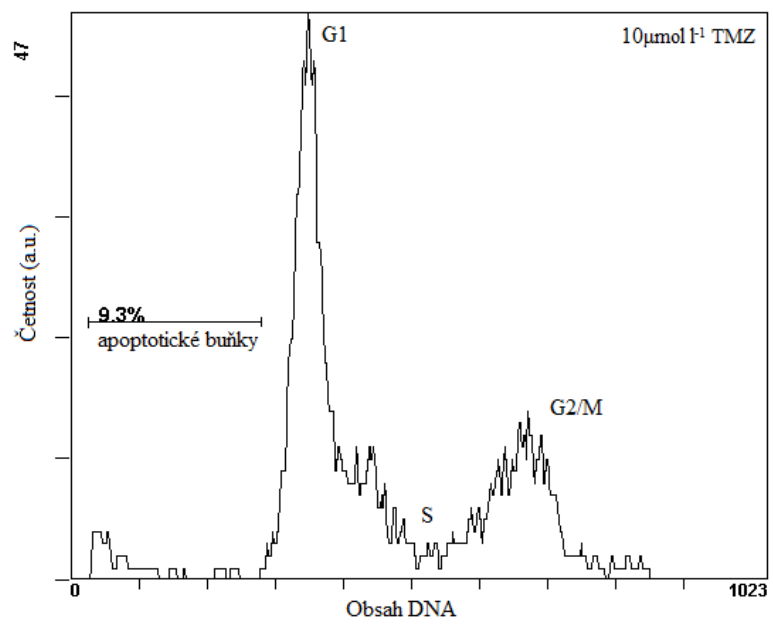
b)



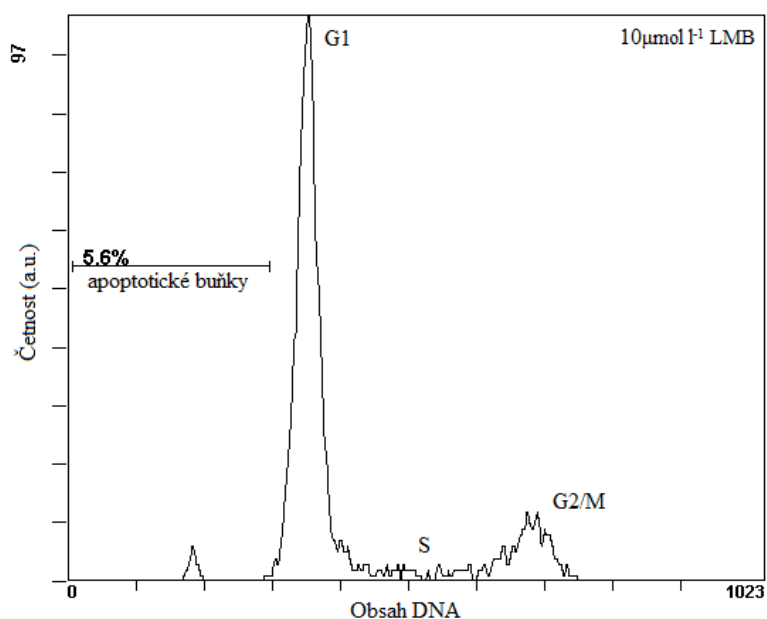
c)



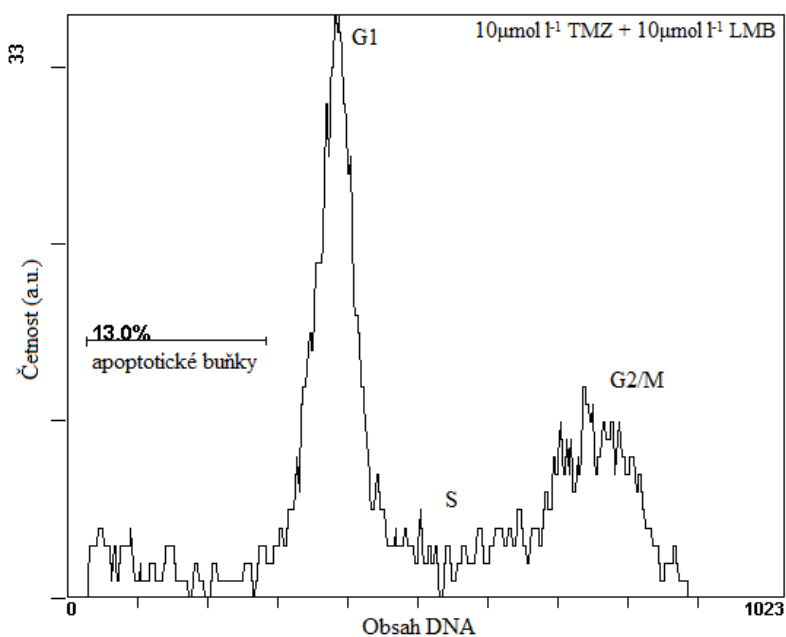
d)



e)

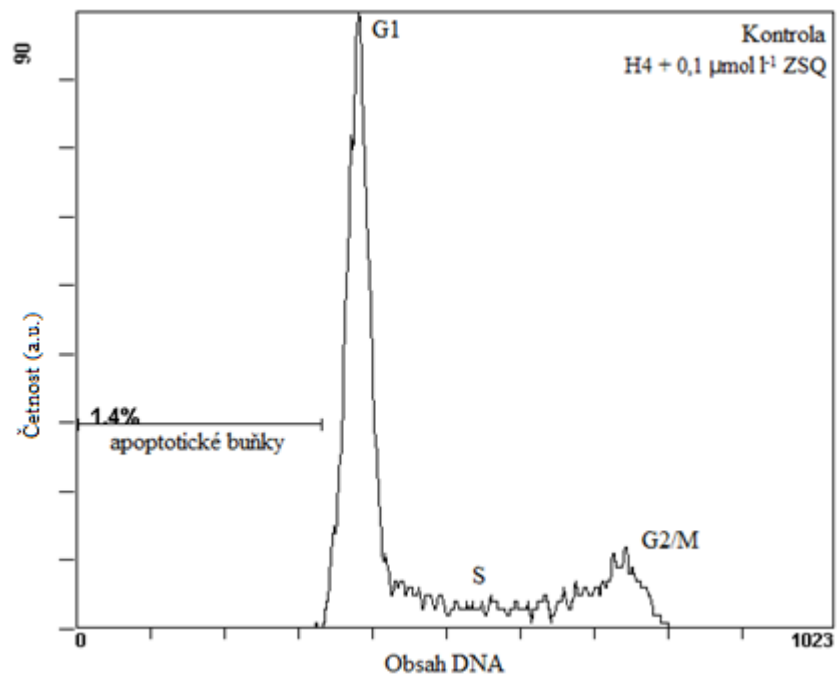
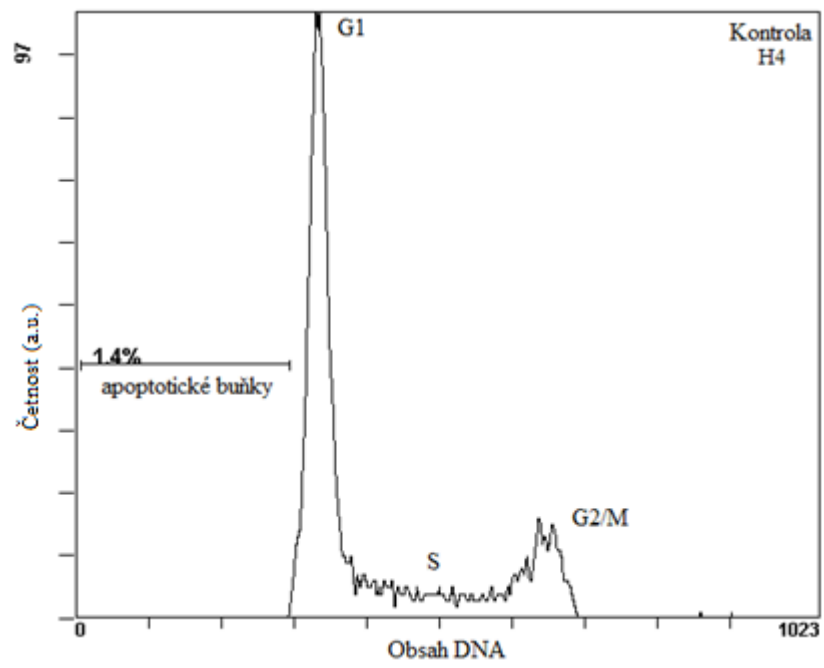


f)

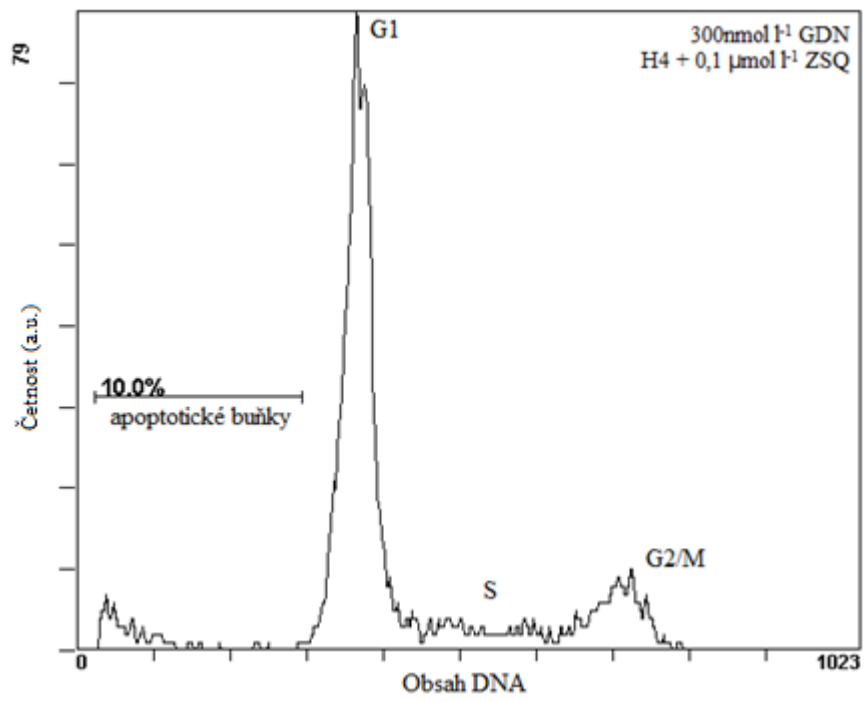
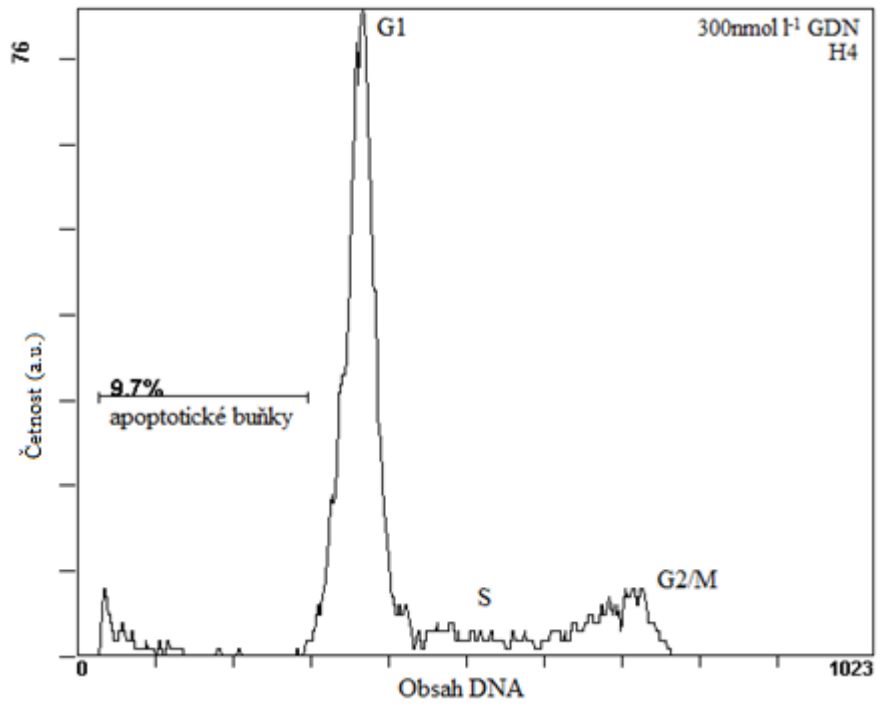


Obr. 21 Analýza buněčného cyklu u buněk U87 inkubovaných s GDN, 17-AAG, TMZ a LMB. Buňky U87 byly kultivovány 120 h při 37 °C ve standardním růstovém médiu, obarveny propidium jodidem a měřeny na průtokovém cytometru. Kontrolní buňky U87 (a), buňky U87 s přidavkem 300 nmol l⁻¹ GDN (b), 300 nmol l⁻¹ 17-AAG (c), 10 μmol l⁻¹ TMZ (d), 10 μmol l⁻¹ LMB (e), 10 μmol l⁻¹ TMZ + LMB (f). Na histogramu byla číselně zobrazena četnost apoptotických buněk. Na ose x byla zobrazena intenzita naměřené fluorescence propidium jodidu, odpovídající množství DNA v jádře. Na ose y byla relativní četnost buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. 17-AAG – tanespimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid.

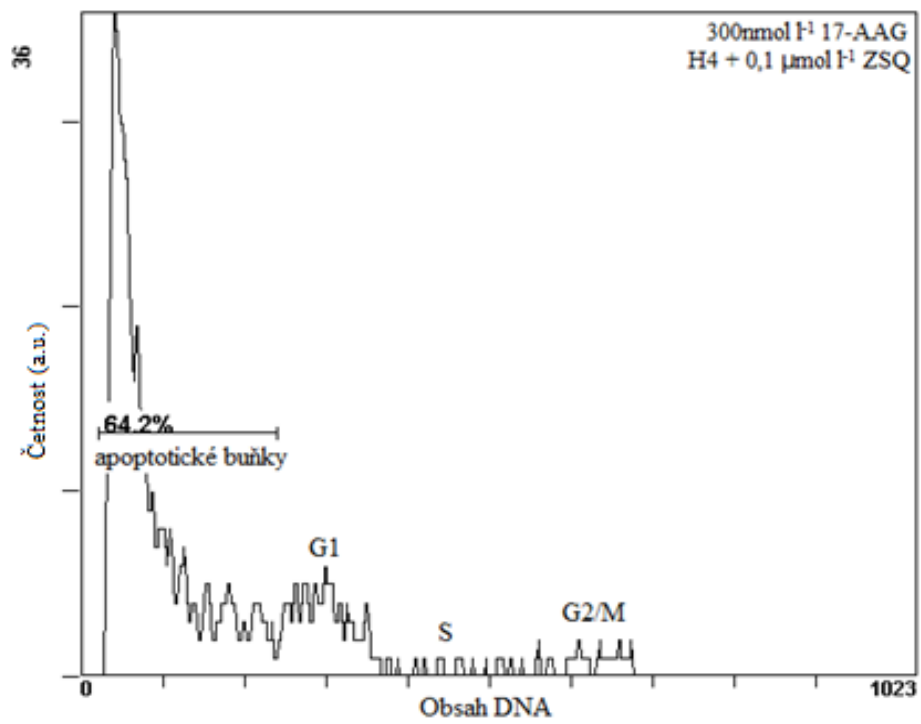
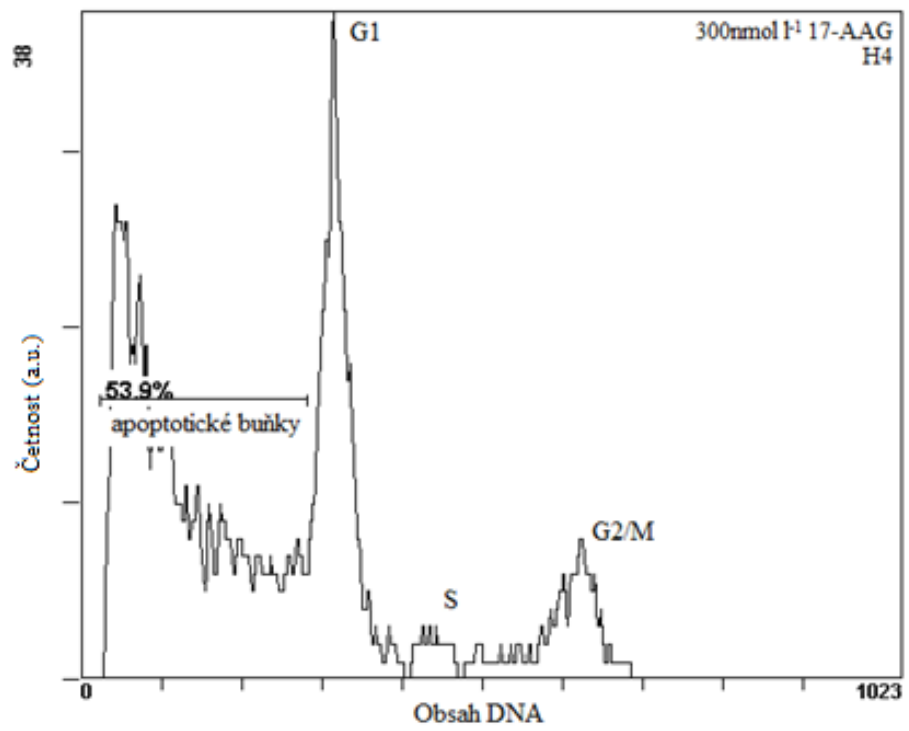
a)



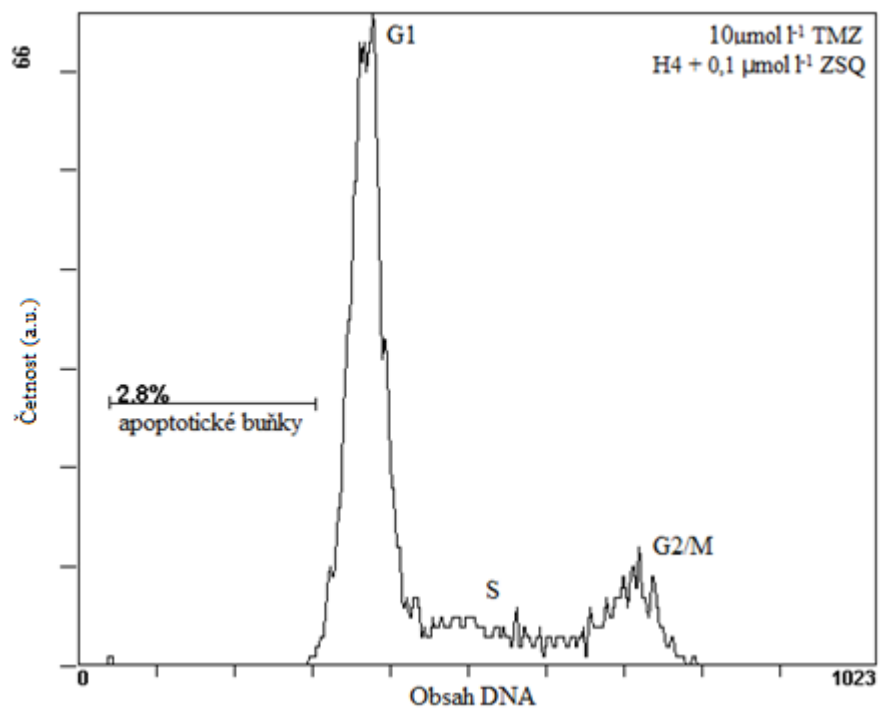
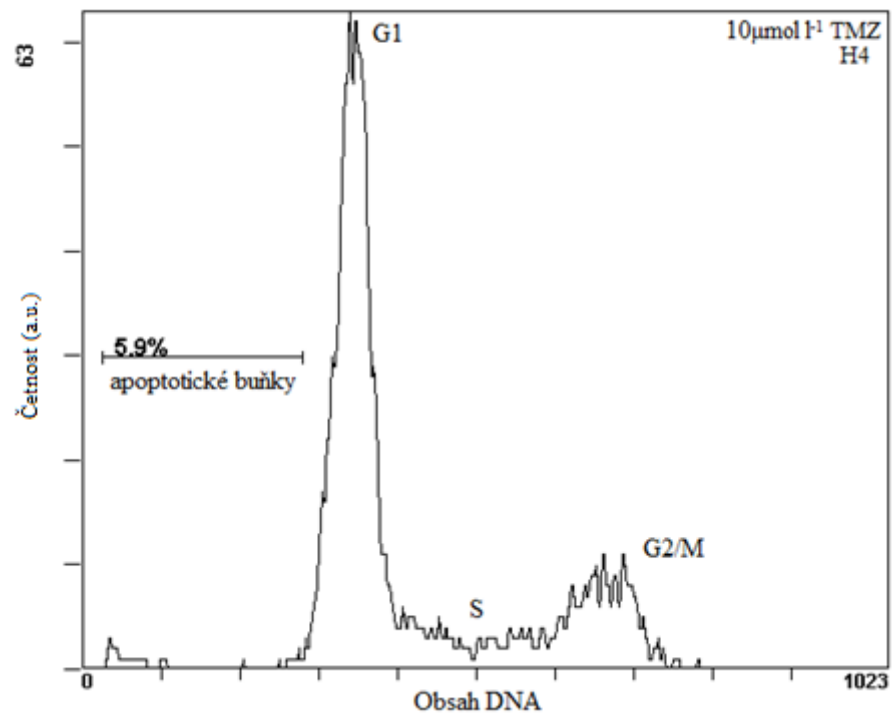
b)



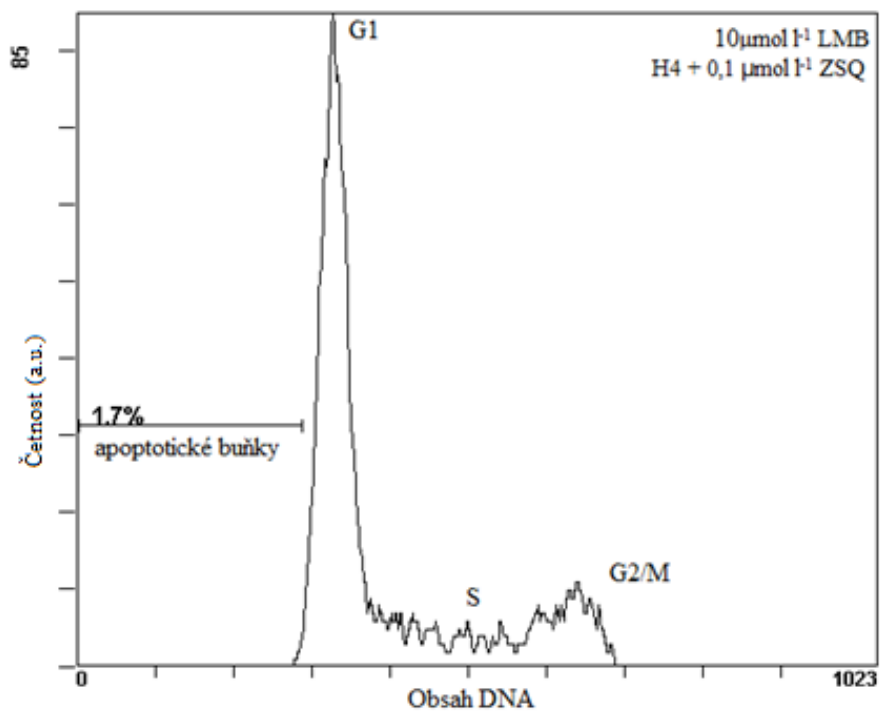
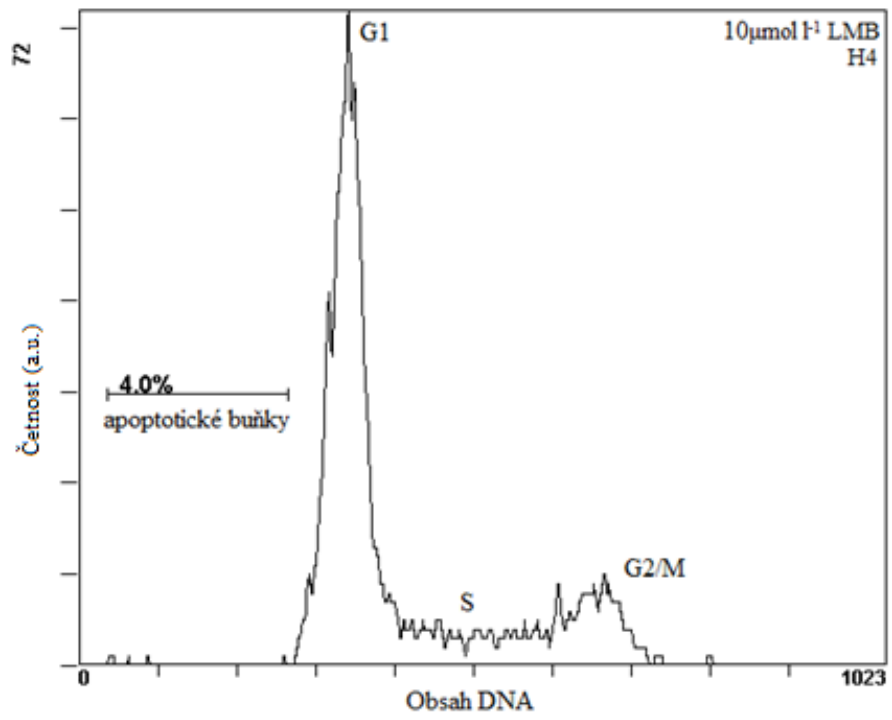
c)



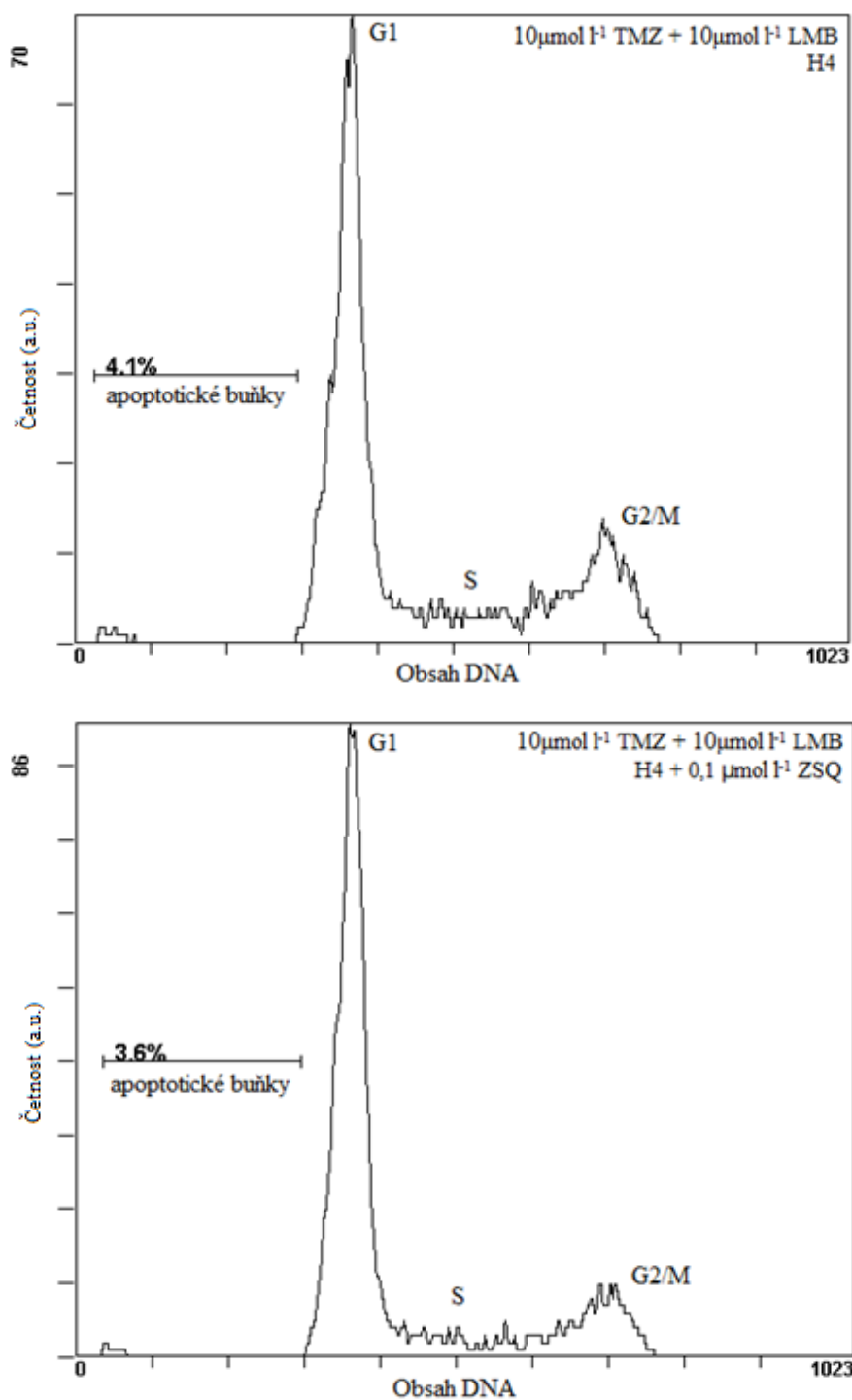
d)



e)

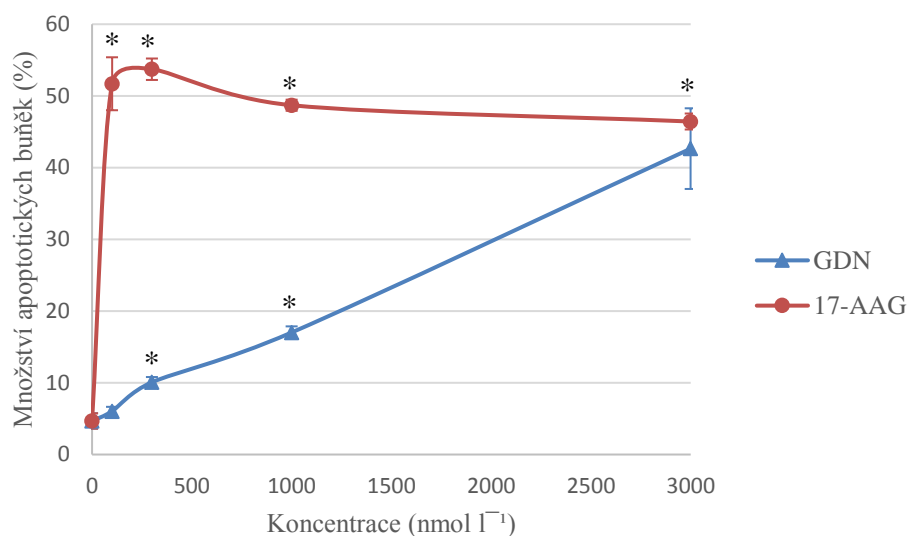


f)

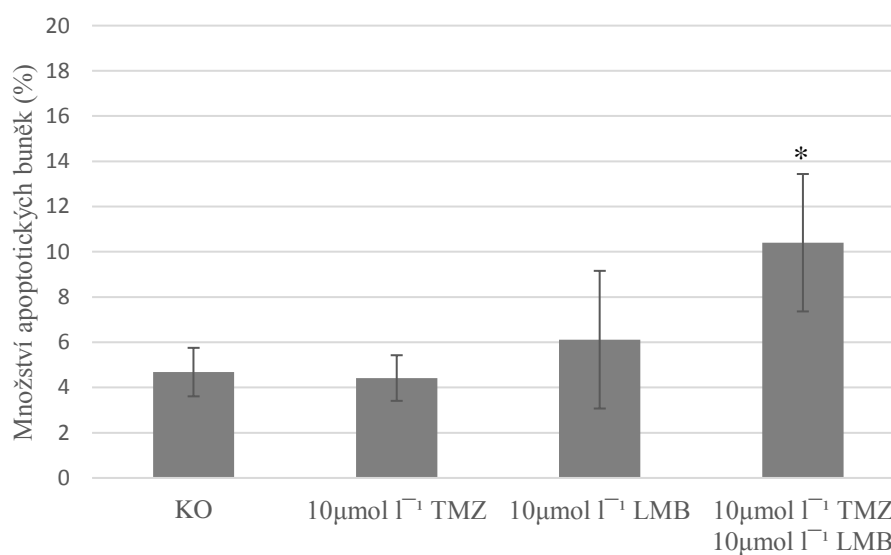


Obr. 22 Analýza buněčného cyklu u buněk H4, H4 s ZSQ inkubovaných s GDN, 17-AAG, TMZ, LMB a s inhibítorem $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ZSQ. Buňky H4 byly kultivovány 120 h ve standardním růstovém médiu, obarveny Vindalovým roztokem a měřeny na průtokovém cytometru. Kontrolní buňky H4 (a), buňky H4 s přidavkem 300 nmol l^{-1} GDN (b), 300 nmol l^{-1} 17-AAG (c), $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ TMZ (d), $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ LMB (e), $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ TMZ + LMB (f). Na histogramu byla číselně zobrazena četnost apoptotických buněk. Na ose x byla zobrazena intenzita naměřené fluorescence propidium jodidu, odpovídající množství DNA v jádře. Na ose y byla relativní četnost buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. 17-AAG – tanespimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid, ZSQ – zosuquidar.

a)

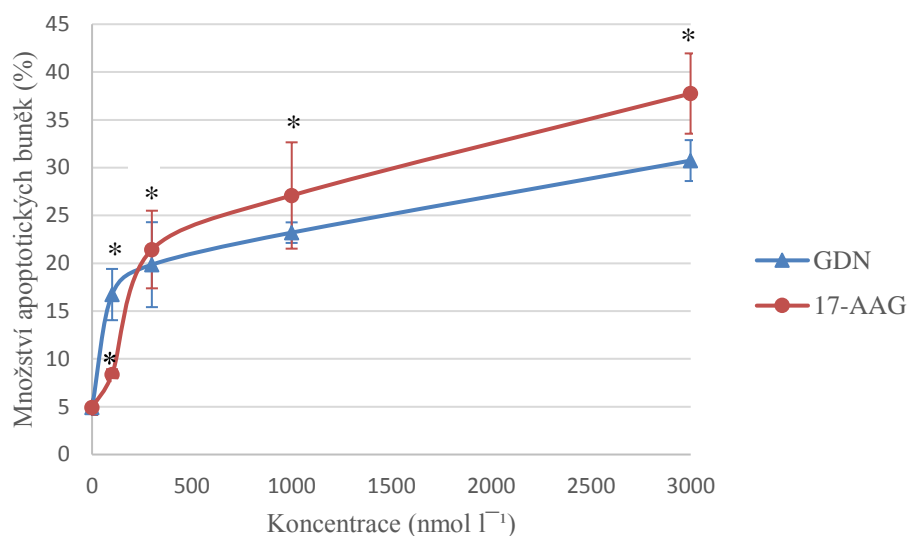


b)

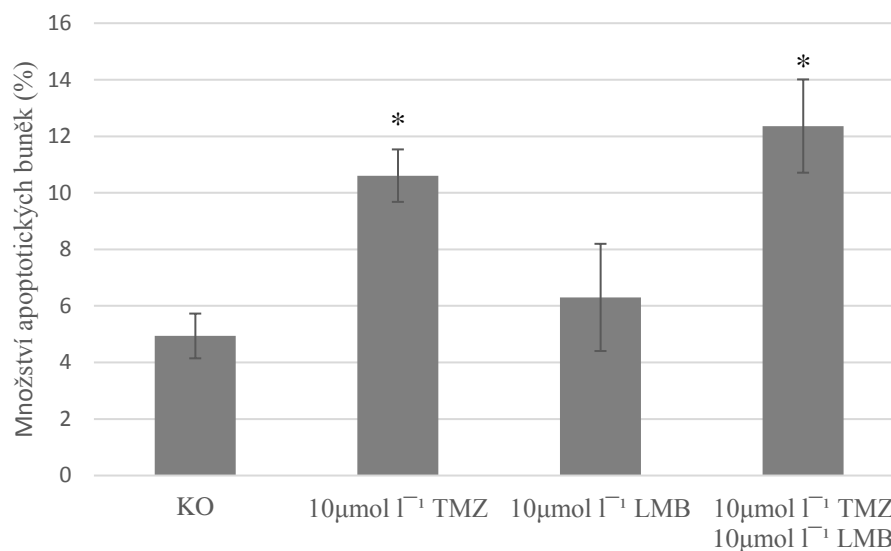


Obr. 23 Analýza buněčného cyklu u buněčné linie T98G inkubovaných s GDN, 17-AAG, TMZ a LMB. Buňky byly kultivovány 120 h při 37 °C ve standardním růstovém médiu, následně byly obarveny Vindalovým roztokem a měřeny na průtokovém cytometru. Buňky T98G inkubované s GDN a 17-AAG (100, 300, 1000, 3000 nmol l⁻¹) (a), buňky s přidavkem 10 μmol l⁻¹ TMZ, LMB nebo kombinací obou léčiv (b). Střední chyba průměru byla vypočítána z 6 replikátů. * - statisticky významný rozdíl u buněčné linie T98G neovlivněné chemoterapeutiky a po působení látek GDN, 17-AAG, léčiv TMZ a LMB (P<0,05). 17-AAG – tanespimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid.

a)

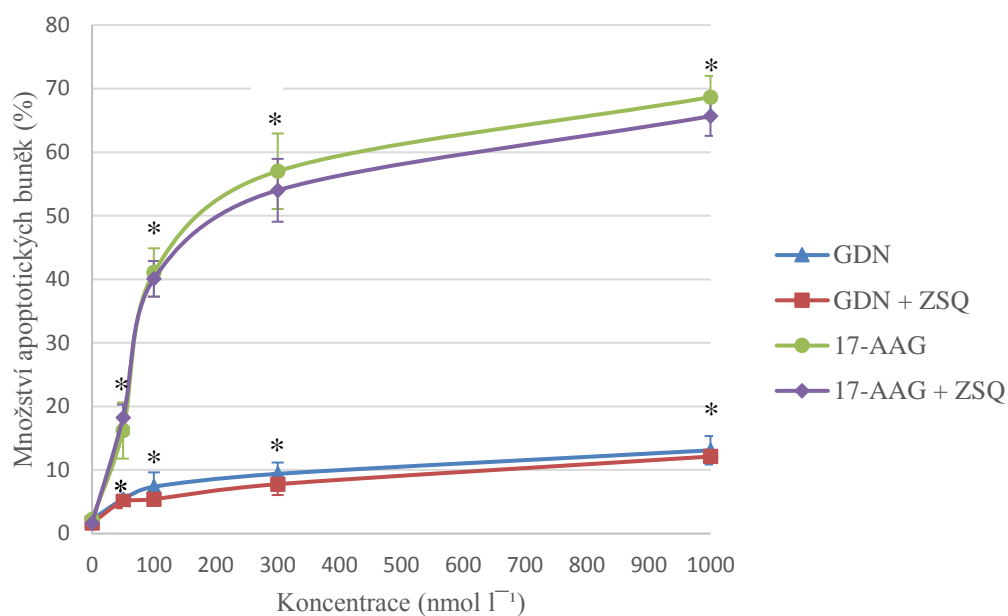


b)

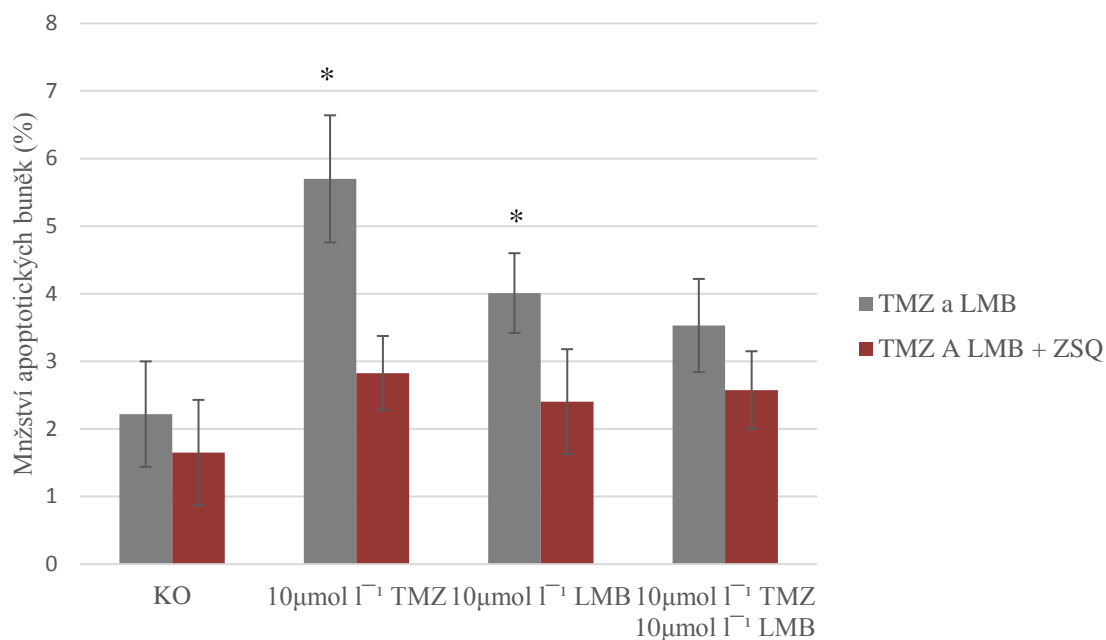


Obr. 24 Analýza buněčného cyklu u buněčné linie U87 inkubovaných s GDN, 17-AAG, TMZ a LMB. Buňky byly kultivovány 120 h při 37 °C ve standardním růstovém médiu, následně byly obarveny Vindalovým roztokem a měřeny na průtokovém cytometru. Buňky U87 inkubované s GDN a 17-AAG (100, 300, 1000, 3000 nmol l⁻¹) (a), buňky s přidavkem 10 μmol l⁻¹ TMZ, LMB nebo kombinací obou léčiv (b). Střední chyba průměru je vypočítána z 6 replikátů. * - statisticky významný rozdíl u buněčné linie U87 neovlivněné chemoterapeutiky a po působení látek GDN, 17-AAG, léčiv TMZ a LMB, (P<0,05). 17-AAG – tanespimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid.

a)

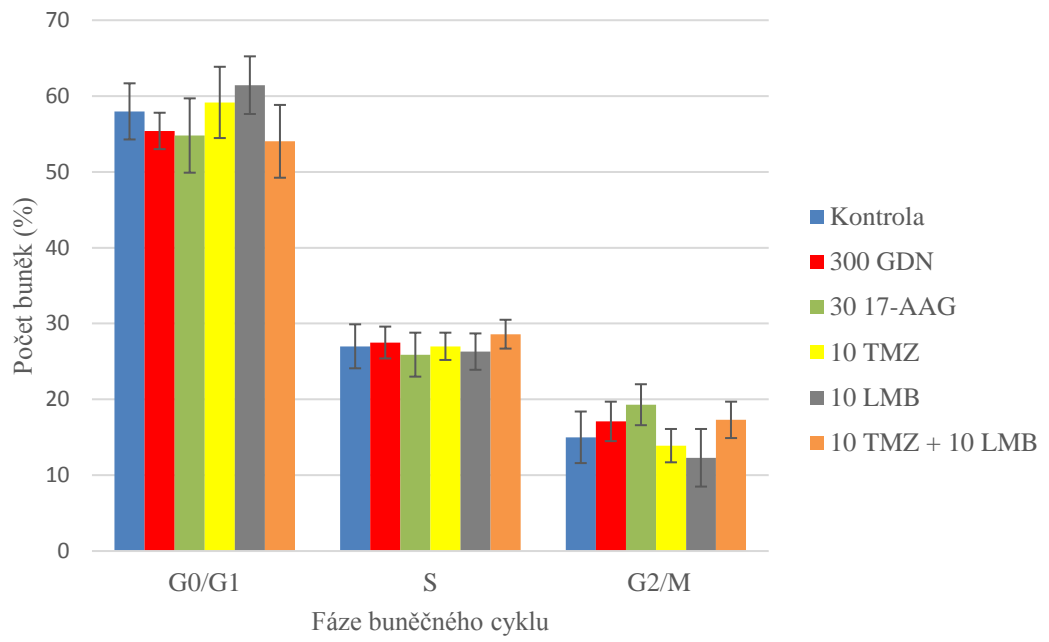


b)

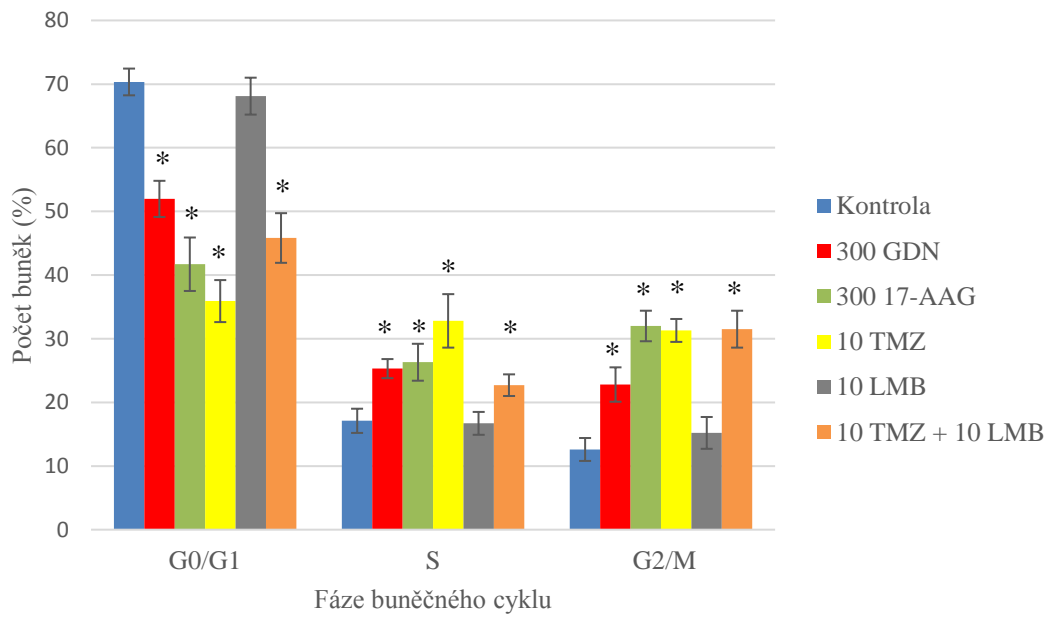


Obr. 25 Analýza buněčného cyklu u buněčné linie H4 a H4 s ZSQ inkubovaných s GDN, 17-AAG, TMZ a LMB a s přidavkem 0,1 μmol l⁻¹ ZSQ. Buňky byly kultivovány 120 h při 37 °C ve standardním růstovém médiu, následně byly obarveny Vindalovým roztokem a měřeny na průtokovém cytometru. Buňky H4 inkubované s GDN a 17-AAG (50, 100, 300, 1000 nmol l⁻¹) (a), buňky s přidavkem 10 μmol l⁻¹ TMZ, LMB nebo kombinací obou léčiv (b). Střední chyba průměru je vypočítána z 6 replikátů. * - statisticky významný rozdíl u buněčné linie H4 neovlivněné chemoterapeutiky a po působení látek GDN, 17-AAG, léčiv TMZ a LMB (P<0,05). 17-AAG – tanespimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid, ZSQ – zosuquidar.

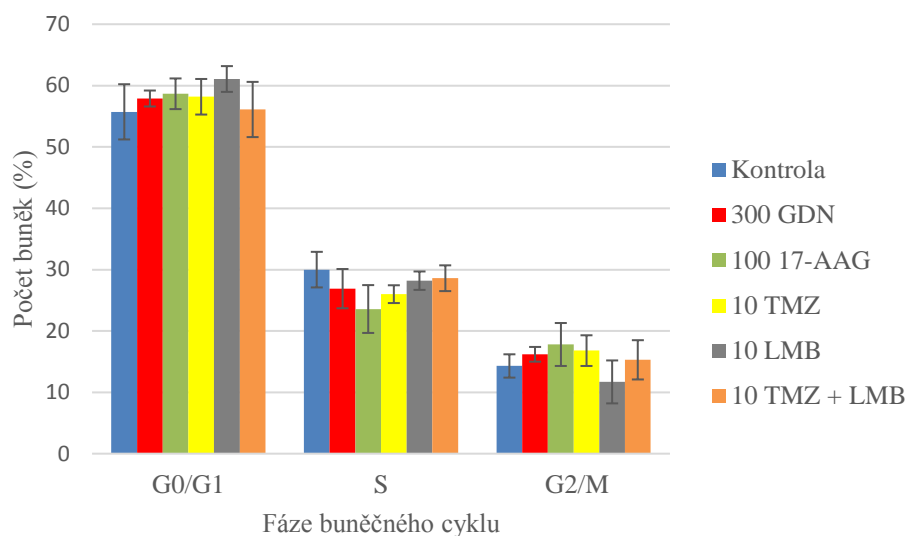
a)



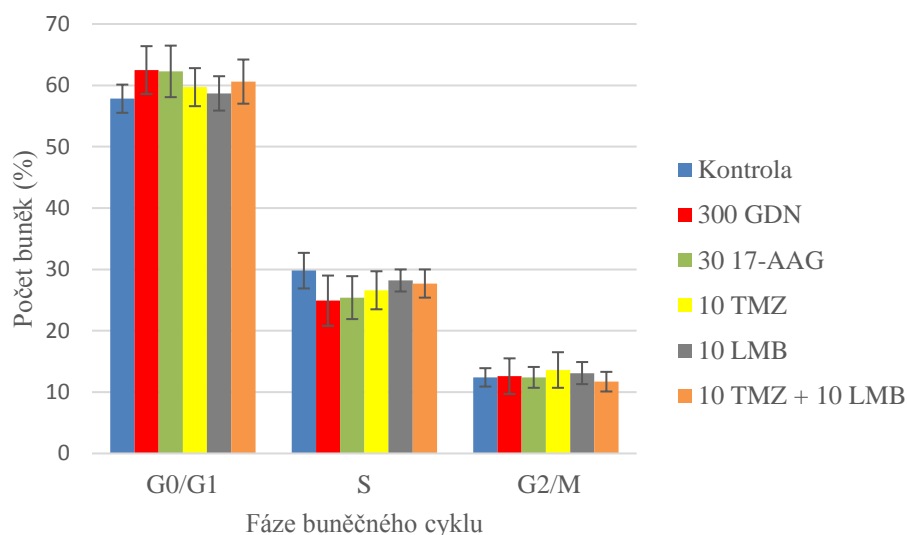
b)



c)



d)

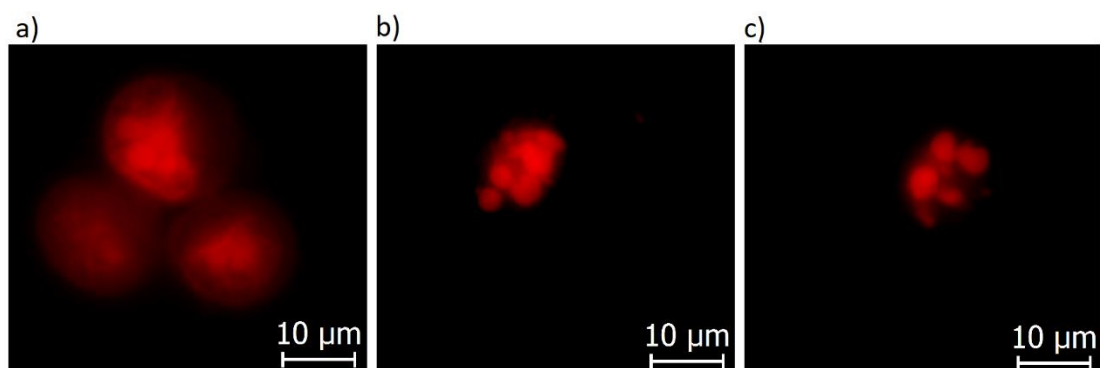


Obr. 26 Zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Byly použité buněčné linie T98G (a), U87 (b), H4 (c) a H4 s přidavkem $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ZSQ (d) inkubovaných s GDN (300 nmol l^{-1}), 17-AAG ($30, 100, 300 \text{ nmol l}^{-1}$), 10 TMZ ($10 \mu\text{mol l}^{-1}$), 10 LMB ($10 \mu\text{mol l}^{-1}$), 10 TMZ + 10 LMB ($10 \mu\text{mol l}^{-1}$). Buňky byly kultivovány 120 h při 37°C ve standardním růstovém médiu, následně byly obarveny Vindalovým roztokem a měřeny na průtokovém cytometru. Střední chyba průměru je vypočítána ze 3 replikátů. * - statisticky významný rozdíl u buněčných linií neovlivněných chemoterapeutiky a po působení látek GDN, 17-AAG, léčiv TMZ a LMB, ($P < 0,05$). 17-AAG – tanespimycin, GDN – geldanamycin, LMB – lomequatrib, TMZ – temozolomid, ZSQ – zosuquidar.

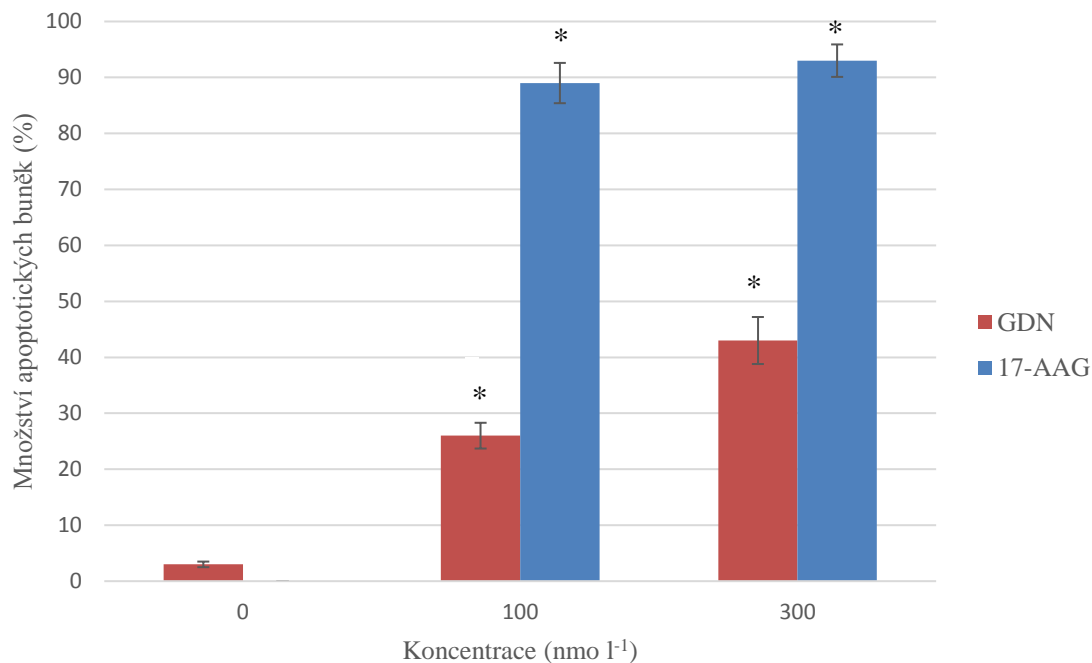
4.8 Vliv geldanamycinu a tanespimycinu na morfologii jader u buněk glioblastomu

Buněčný cyklus nedokáže odhalit veškeré apoptotické buňky. K ověření, zda dochází k buněčné smrti apoptotickým mechanismem, byla u buněčné linie H4 zkoumána morfologie jader. Buňky byly zafixovány v ethanolu, následně obarveny propidium jodidem. U buněk H4 byly pozorovány intaktní a buňky tvořící apoptotická tělíska pomocí fluorescenčního mikroskopu (Obr. 27). U buněčné linie H4 inkubované s GDN a 17-AAG došlo k apoptose.

U buněčné linie H4 se prokázal vliv GDN a 17-AAG na morfologii a počet apoptotických jader. Buněčné linie T98G a U87 se dělaly naposledy (výsledky neuvedeny). Buňky ošetřeny 17-AAG vykazují vysoké počty apoptotických buněk. U buněk H4 bylo sledováno množství apoptotických jader, které byly počítány fluorescenčním mikroskopem. U buněk H4 po inkubaci s 17-AAG (100 a 300 nmol l⁻¹) bylo mikroskopem zjištěno až 90 % apoptotických jader. Buněčná linie H4 po ošetření GDN obsahovala 26 % (100 nmol l⁻¹) a 43 % (300 nmol l⁻¹) apoptotických jader (Obr. 28).



Obr. 27 Typický obrázek morfologie jader u buněčné linie H4 barvené propidium jodidem při 1000x zvětšení. Kontrolní neošetřená buňka H4 (a), H4 po 120 h působení 100 nmol l⁻¹ geldanamycinu (b) a H4 po 120 h působení 100 nmol l⁻¹ tanespimycinu. Velikost měřítka bylo 10 μm.



Obr. 28 Analýza morfologie jader. Vliv látek geldanamycinu (GDN) a tanespimycinu (17-AAG) na množství apoptotických jader u buněčné linie H4. Buňky byly fixovány v ethanolu, barveny propidium jodidem a pozorovány fluorescenčním mikroskopem při 400x zvětšení. U každého vzorku bylo vždy počítáno 200 jader. Výsledky jsou získány ze 3 měření se směrodatnou odchylkou. * - statisticky významný rozdíl u buněčné linie H4 neovlivněné chemoterapeutiky a po působení látek GDN a 17-AAG ($P < 0,05$).

5 DISKUSE

V teoretické části diplomové práce byly popsány vlastnosti nádorové buňky, charakteristika HSPs a využití jejich inhibitorů jako potenciálních léčiv. Dále byly popsány mechanismy vzniku MDR. Poslední část práce se zabývá nádorovým onemocněním GBM. Současnou léčbou GBM je chirurgická resekce, ozařování a aplikace chemoterapeutik. Pokud nejsou pacienti s diagnózou GBM léčeni, umírají do tří měsíců. Po provedení léčby je u pacientů medián přežití prodloužen přibližně na jeden rok (Krex *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2011). I přes pokroky v cílené terapii nedošlo k výraznému zlepšení léčby, proto se stále hledají další alternativní léčby (viz. kapitola 4. 2).

V roce 2009 Stupp a jeho kolegové objevili nejdůležitější prognostický marker pro léčbu GBM, jedná se o methylovaný promotor genu pro *MGMT*. U pacientů s methylovaným promotorem *MGMT* byla pozorována lepší účinnost chemoterapie TMZ s radioterapií. Wang *et al.* (2013) zjistili vztah mezi mutací *TP53* a expresí *MGMT*. Výsledky ukázaly, že nemutovaný *TP53* zvyšuje citlivost buněk k TMZ. V našich experimentech jsme dokázali, že vyšší citlivost k TMZ mají buňky U87, protože mají nemutovaný *TP53* a sníženou expresi *MGMT*. U buněk T98G neměl TMZ žádný efekt z důvodu mutace v *TP53* a zvýšené exprese *MGMT*. Pokud buňky mají mutovaný *TP53* a zároveň zvýšenou expresi *MGMT*, jsou většinou k TMZ rezistentní. Ačkoliv buněčná linie H4 měla nemutovaný *TP53*, ale měla zvýšenou expresi *MGMT*, byla tak rezistentní k TMZ (Hegi *et al.*, 2005).

Dalším prognostickým faktorem u GBM je mutace genu pro *IDH1/2*. *IDH1/2* je součástí Krebsova cyklu, katalyzuje oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na α -ketoglutarát za současné tvorby NADPH a CO_2 . Vzniklý NADPH je důležitý pro regeneraci GSH. Mutace *IDH1/2* se častěji vyskytuje u sekundárních GBM s mutací genu *TP53*, tím dochází k diferenciaci gliomu. Pokud buňka obsahuje mutaci v *IDH1/2*, má vyšší citlivost vůči TMZ. V současné době se využívá jako prognostický faktor po léčbě GBM (Parsons *et al.*, 2008; Sanson *et al.*, 2009; Karsy *et al.*, 2015).

Jedním z problémů při léčbě nádoru GBM je snížený transport většiny chemoterapeutik přes HEB do mozku. Bariéra obsahuje lékové transportéry, které vedou ke vzniku lékové rezistence. Zkoumanými lékovými transportéry u GBM jsou ABCB1, ABCC1 a ABCG2 (Zhang *et al.*, 2003). V diplomové práci jsme

se zaměřili na ABCB1 transportér. Exprese a funkce P-gp byla ověřena pomocí průtokové cytometrie (Obr. 12 a 13). Podle analýzy LC-MS/MS jsme zjistili, že GDN je transportován vyšší účinností než 17-AAG (Obr. 14). Z MTT testu byla stanovena cytotoxická účinnost látek GDN a 17-AAG vzhledem k expresi *ABCB1*. U buněk DOX1 byla naměřena nejnižší účinnost látek, kvůli vysoké expresi P-gp. Vysokou účinnost v nanomolární koncentraci měl derivát 17-AAG u všech buněčných liniích (Tab. 2).

Nádory GBM patří k méně četným nádorovým onemocněním, obsahují přibližně 1 % všech nádorů (Gladson *et al.*, 2010). Při léčbě GBM jsou hlavním problémem jednotlivé mutace genů, např. methylace promotoru *MGMT* v buněčných liniích, a tím dochází ke vzniku rezistence vůči podávaným chemoterapeutikům (Dunn *et al.*, 2012). V práci jsme použili tři glioblastomové buněčné linie s různým genetickým pozadím (Tab. 3). V dnešní době stále neexistuje žádný lék, který by odpovídal na všechny mutace, a navíc by ještě musel procházet HEB. Současná kombinovaná léčba s TMZ není úspěšná. Naše výsledky v *in vitro* testech ukázaly, že po použití TMZ ($10 \mu\text{mol l}^{-1}$) byla účinnost léčiva stále nízká. U TMZ v kombinaci s inhibítorem LMB byl pozorován podobný efekt (Tab. 4).

Existuje několik směrů v léčbě GBM, ale žádný není uspokojivý, my jsme se zaměřili na inhibitory HSPs GDN a 17-AAG. Látky bez ohledu na genetické pozadí, expresi P-gp *in vitro* testech ukazují vynikající výsledky. Důležité je, aby inhibitory vůbec či slabě interagovaly s ABCB1 transportérem v HEB. GDN je pouze modelová látka, kvůli cytotoxicitě se nepoužívá v klinických testech. Proto byly nasyntetizovány deriváty GDN s lepšími farmakologickými vlastnostmi (např. 17-AAG, 17-DMAG, IPI-504). V našich testech jsme využili derivát 17-AAG. V současné době se využívá při léčbě karcinomu prsu, prostaty, ledvin a melanomu (Wang *et al.*, 2016). Byl proveden standardní MTT test, analýza transmembránového mitochondriálního potenciálu, buněčného cyklu a morfologie jader u buněk GBM.

Při analýzách buněčné linie H4 jsme zjistili zvýšenou expresi *ABCB1*. Exprese P-gp ovlivní cytotoxický účinek vůči GDN a 17-AAG. U buněk H4 byla ověřena exprese P-gp pomocí western blottu. Exprese P-gp u buněčné linie DOX3_6 byla přibližně 2,5x vyšší než u buněk H4 (Obr. 15). Funkce u buněčné linie H4 byla porovnávána s buňkami DOX3_6 a K562 (Obr. 16). Účinnost GDN a 17-AAG je vysoká i přes zvýšenou expresi P-gp.

Vyhodnocení MTT testu ukázalo, že látky GDN a 17-AAG inhibují proliferaci a viabilitu u všech buněčných liniích (Tab. 4). MTT test je nedostačující metoda, protože nedokáže odhadnout, zda je inhibována proliferace nebo je proliferace snížena na úkor viability nebo jestli mají vliv obě složky.

Další metodou pro stanovení viability buněk byla použita analýza transmembránového mitochondriálního potenciálu. Z výsledků je patrné, že pokles proliferace jde na úkor indukce buněčné smrti. U všech buněk byla nejúčinnější látkou 17-AAG (Obr. 17-19).

Analýzou buněčného cyklu se zjistí počet apoptotických buněk (Obr. 20-25). Pomocí histogramu bylo u buněk U87 zjištěno, že GDN, 17-AAG i TMZ a TMZ + LMB způsobí zastavení buněčného cyklu v G₂/M fázi. U ostatních buněčných linií H4 a T98G nebyl zaznamenán žádný efekt (Obr. 26). K potvrzení apoptosy, byla provedena morfologie jader pomocí fluorescenčního mikroskopu. U buněk byly potvrzeny morfologické znaky apoptosy. Buňka ošetřena s GDN nebo 17-AAG se rozpadá a tvoří apoptotická tělíška (Obr. 27 a 28).

Experimenty dokazují, že 17-AAG má nižší cytotoxicitu, vyšší účinnost v nanomolární koncentraci a interakce s P-gp je nižší než GDN. Díky analýze buněčného cyklu a stanovení morfologie jader, bylo zjištěno, že typ buněčné smrti je apoptotický s morfologickými a biochemickými znaky. V *in vitro* testech 17-AAG vykazuje skvělou účinnost.

6 ZÁVĚR

- V teoretické části této práce byly shrnuty vlastnosti nádorové buňky, charakteristika HSPs a účinek jejich inhibitorů. V následující části byly popsány mechanismy vzniku lékové rezistence. Poslední část popisuje charakteristiku GBM a současnou léčbu.
- Transport a cytotoxicita obou inhibitorů HSP90 závisí na expresi P-gp. Výraznou rezistenci vůči oběma inhibitorům zprostředkovává pouze velmi vysoká exprese P-gp.
- Stručně jsme charakterizovali buněčné linie T98G, U87 a H4. U buněk H4 jsme zjistili zvýšenou expresi P-gp.
- MTT testem bylo dokázáno, že 17-AAG inhibuje proliferaci a viabilitu u buněk glioblastomu v nanomolárních koncentracích. GDN inhiboval proliferaci a viabilitu při vyšších koncentracích než 17-AAG. Buňky H4 byly přibližně 10x méně citlivé ke GDN a přibližně 5 až 6x méně citlivé k 17-AAG, i přesto byly oba inhibitory vysoce cytotoxické a hodnoty IC_{50} byly $626,2 \text{ nmol l}^{-1}$ pro GDN a $26,2 \text{ nmol l}^{-1}$ pro 17-AAG. Pozorovanou rezistenci bylo možno revertovat aplikací inhibitorů P-gp.
- Pomocí měření transmembránového mitochondriálního potenciálu jsme zjistili, že oba inhibitory indukují buněčnou smrt v nanomolárních koncentracích.
- Mikroskopická analýza buněčných jader ukázala, že oba inhibitory indukují buněčnou smrt s morfologickými rysy apoptosy.
- Z histogramu bylo zjištěno, že GDN, 17-AAG a TMZ způsobují blok v G_2/M fázi u buněk U87. U ostatních glioblastomových linií nebyl pozorován žádný efekt v buněčném cyklu.
- Účinek inhibitorů HSP90 byl porovnán s léčivem TMZ a LMB. Cytotoxicita TMZ byla velmi nízká, hodnoty IC_{50} byly $>10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Kombinace TMZ s inhibitorem LMB měl také malý efekt.

7 LITERATURA

- Abdullahi W., Davis T. P., Ronaldson P. T. (2017): Functional expression of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides at the blood-brain barrier: Understanding transport mechanisms for improved CNS drug delivery? *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* **19**, 931–939.
- Adams J. M., Elliot P. J. (2000): New agents in cancer clinical trials. *Oncogene* **19**, 6687-6692.
- Adams J. M., Cory S. (2007): The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324-1337.
- Adekola K., Rosen S. T., Shanmugam M. (2012): Glucose transporters in cancer metabolism. *Current Opinion in Oncology* **24**, 650-654.
- Agarwala S. S., Kirkwood J. M. (2000): Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *The Oncologist* **5**, 144–151.
- Agnihotri S., Gajadhar A. S., Ternamian C., Gorlia T., Diefes K. L., Mischel P. S., Kelly J., McGown G., Thorncroft M., Carlson B. L., Sarkaria J. N., Margison G. P., Aldape K., Hawkins C., Hegi M., Guha A. (2012): Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *The Journal of Clinical Investigation* **122**, 253-266.
- Allen J. D., van Loevezijn A., Lakhai J. M., van der Valk M., van Tellingen O., Reid G., Schellens J. H., Koomen G. J., Schinkel A. H. (2002): Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter *in vitro* and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Molecular Cancer Therapeutics* **1**, 417-425.
- Almokadem S., Belani C. P. (2012): Volociximab ic cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* **12**, 251-257.
- Ambudkar S. V., Dey S., Hrycyna C. A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M. M. (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**, 361–398.
- Artandi S. E., De Pinho R. A. (2010): Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 9–18.
- Ashkenazi A., Dixit V. M. (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Baeriswyl V., Christofori G. (2009): The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* **19**, 329–337.
- Bai R. I., Staedtke V., Riggins G. J. (2011): Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends in Molecular Medicine* **17**, 301-312.
- Batrakova E. V., Miller D. W., Li S., Alakhov V. Y., Kabanov A. V., Elmquist W. F. (2001): Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: *in vitro* and *in vivo* studies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **296**, 551–557.
- Bergers G., Benjamin L. E. (2003): Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer* **3**, 401-410.
- Bergers G., Song S. (2005): The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology* **7**, 452–464.
- Beutler B. A. (2009): TLRs and innate immunity. *Blood* **113**, 1399-1407.
- Blasco M. A. (2005): Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics* **6**, 611–622.
- Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. (2000): A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 1295–301.
- Boumendjel A., Baubichon-Cortay H., Trompier D., Perrotton T., Di Pietro A. (2005): Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: Recent advances in the discovery of reversal agents. *Medicinal Research Reviews* **25**, 453-472.
- Bram E. E., Adar Y., Mesika N., Sabisz M., Skladanowski A., Assaraf Y. G. (2009a): Structural determinants of imidazoacridinones facilitating antitumor activity are crucial for substrate recognition by ABCG2. *Molecular Pharmacology* **75**, 1149–1159.

- Bram E. E., Stark M., Raz S., Assaraf Y. G. (2009b): Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance. *Neoplasia* **11**, 1359–1370.
- Bull H. A., Brickell P. M., Dowd P. M. (1994): Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells. *The Federation of European Biochemical Societies Letters* **351**, 41–44.
- Burkhardt D. L., Sage J. (2008): Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer* **8**, 671–682.
- Carmeliet P. (2005): VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69**, 4–10.
- Chaika N. V., Gebregiworgis T., Lewallen M. E., Purohit V., Radhakrishnan P., Liu X., Zhang B., Mehla K., Brown R. B., Caffrey T., Yu F., Johnson K. R., Powers R., Hollingsworth M. A., Singh P. K. (2012): MUC1 mucin stabilizes and activates hypoxia-inducible factor 1 alpha to regulate metabolism in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 13787–13792.
- Cherubini A., Ruggiero C., Morand C., Lattanzio F., Dell'aquila G., Zuliani G., Di Iorio A., Andres-Lacueva C. (2008): Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Current Medicinal Chemistry* **15**, 1236–1248.
- Chu C. W., Yang M. C., Chou C. H., Huang W. S., Hsiao B. X., Wang Y. T., Chiou S. J., Loh J. K., Hong Y. R. (2018): GSK3 β -mediated Ser156 phosphorylation modulates a BH3-like domain in BCL2L12 during TMZ-induced apoptosis and autophagy in glioma cells. *International Journal of Molecular Medicine* **42**, 905–918.
- Chufan E. E., Sim H. M., Ambudkar S. V. (2015): Molecular basis of the polyspecificity of P-glycoprotein (ABCB1): recent biochemical and structural studies. *Advances in Cancer Research* **125**, 71–96.
- Cole S. P., Bhardwaj G., Gerlach J. H., Mackie J. E., Grant C. E., Almquist K. C., Stewart A. J., Kurz E. U., Duncan A. M., Deeley R. G. (1992): Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650–1654.
- Dameron K. M., Volpert O. V., Tainsky M. A., Bouck N. (1994): Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* **265**, 1582–1584.
- Dantzig A. H., Shepard R. L., Cao J., Law K. L., Ehlhardt W. J., Baughman T. M., Bumol T. F., Starling J. J. (1996): Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropylidibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Research* **56**, 4171–4179.
- Davies M. A., Samuels Y. (2010): Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* **29**, 5545–5555.
- Davis J. M., Rowley S. D., Braine H. G., Piantadosi S., Santos G. W. (1990): Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood* **75**, 781–786.
- De Berardinis R. J., Lum J. J., Hatzivassiliou G., Thompson C. B. (2008): The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism* **7**, 11–20.
- De Nardo D. G., Andreu P., Coussens L. M. (2010): Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews* **29**, 309–316.
- De Nicola G. M., Karreth F. A., Humpton T. J., Gopinathan A., Wei C., Frese K., Mangal D., Yu K. H., Yeo C. J., Calhoun E. S., Scrimieri F., Winter J. M., Hruban R. H., Iacobuzio-Donahue C., Kern S. E., Blair I. A., Tuveson D. A. (2011): Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–109.
- De Visser K. E., Eichten A., Coussens L. M. (2006): Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer* **6**, 24–37.
- De Vries H. E., Kuiper J., De Boer A. G., Van Berkel T. J. C., Breimer D. D. (1997): The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacological Reviews* **49**, 143–145.
- Dean M., Hamon Y., Chimini G. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* **42**, 1156–1166.
- Deshpande A., Sicinski P., Hinds P. W. (2005): Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* **24**, 2909–2915.

- Dey A., Tergaonkar V., Lane D. P. (2008): Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF-kappaB pathways. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 1031-1040.
- Dohse M., Scharenberg C., Shukla S., Robey R. W., Volkmann T., Deeken J. F., Brendel C., Ambudkar S. V., Neubauer A., Bates S. E. (2010): Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metabolism & Disposition* **38**, 1371–1380.
- Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., Ross D. D. (1998): A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15665–15670.
- Dunn G. P., Rinne M. L., Wykosky J., Genovese G., Quayle S. N., Dunn I. F., Agarwalla P. K., Chheda M. G., Campos B., Wang A., Brennan C., Ligon K. L., Furnari F., Cavenee W. K., Depinho R. A., Chin L., Hahn W. C. (2012): Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes & Development* **26**, 756-784.
- Eiseman J. L., Lan J., Lagattuta T. F., Hamburger D. R., Joseph E., Covey J. M., Egorin M. J. (2005): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 17-demethoxy 17-[[2-(dimethylamino) ethyl]amino]geldanamycin (17DMAG, NSC 707545) in C.B-17 SCID mice bearing MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **55**, 21-32.
- el-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817–825.
- Fan Y., Liu X. (2018): Alterations in expression and function of ABC family transporters at blood-brain barrier under liver failure and their clinical significances. *Pharmaceutics* **10**, 102-115.
- Feder M. E., Hofmann G. E. (1999): Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* **61**, 243-282.
- Fedi P., Tronick S. R., Aaronson S. A. (1997): Growth factors. In: *Cancer Medicine*. (Holland J. F., Bast R. C., Morton D. L., Frei E., Kufe D. W., Weichselbaum R. R. eds.), Williams a Wilkins, Baltimore, 41-64.
- Ferrara N. (2009): Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **29**, 789–791.
- Fidler I. J. (2003): The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer* **3**, 453–458.
- Filipits M., Pohl G., Rudas M., Dietze O., Lax S., Grill R., Pirker R., Zielinski C. C., Hausmaninger H., Kubista E., Samonigg H., Jakesz R. (2005): Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 1161-1168.
- Fink J. R., Muzi M., Peck M., Krohn K. (2015): Multimodality brain tumor imaging: MR imaging, PET, and PET/MR imaging. *Journal of Nuclear Medicine* **56**, 1554-1561.
- Frederick L., Wang X. Y., Eley G., James C. D. (2000): Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Research* **60**, 1383-1387.
- Friedman H. S., Kerby T., Calvert H. (2000): Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical Cancer Research* **6**, 2585–2597.
- Galloway T. J., Indelicato D. J., Amdur R. J., Swanson E. L., Smith A. A., Marcus R. B. (2011): Second tumors in pediatric patients treated with radiotherapy to the central nervous system. *American Journal of Clinical Oncology* **35**, 279-283.
- Galluzzi L., Kroemer G. (2008): Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* **135**, 1161–1163.
- Gately S., Twardowski P., Stack M. S., Cundiff D. L., Grella D., Castellino F. J., Enghild J., Kwaan H. C., Lee F., Kramer R. A. (1997): The mechanism of cancer mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10868-10872.

- Gekeler V., Ise W., Sanders K. H., Ulrich W. R., Beck J. (1995): The leukotriene LTD4 receptor antagonist Mk571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **208**, 345-352.
- Gladson C. L., Prayson R. A., Liu W. M. (2010): The pathobiology of glioma tumors. *Annual Review of Pathology* **5**, 33-50.
- Goldstein L. J., Galski H., Fojo A., Willingham M., Lai S. L., Gazdar A., Pirker R., Green A., Crist W., Brodeur G. M. (1989): Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *Journal of the National Cancer Institute* **81**, 116-124.
- Gooljarsingh L. T., Fernandes C., Yan K., Zhang H., Grooms M., Johanson K., Sinnamon R. H., Kirkpatrick R. B., Kerrigan J., Lewis T., Arnone M., King A. J., Lai Z., Copeland R. A., Tummino P. J. (2006): A biochemical rationale for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors: slow, tight binding inhibition by geldanamycin and its analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7625-7630.
- Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E. (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* **2**, 48-58.
- Grenert J. P., Sullivan W. P., Fadden P., Haystead T. A., Clark J., Mimnaugh E., Krutzsch H., Ochel H. J., Schulte T. W., Sausville E., Neckers L. M., Toft D. O. (1997): The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 23843-23450.
- Grivennikov S. I., Greten F. R., Karin M. (2010): Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899.
- Günther W., Pawlak E., Damasceno R., Arnold H., Terzis A. J. (2003): Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *British Journal of Cancer* **88**, 463-469.
- Hanahan D., Folkman J. (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanahan D., Weinbert R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Harris C. C. (1996): p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic—an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* **17**, 1187-1198.
- Hasselbalch B., Lassen U., Hansen S. (2010): Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: a phase II trial. *Neuro-Oncology* **12**, 508-516.
- Hawle P., Siepmann M., Harst A., Siderius M., Reusch H. P., Obermann W. M. (2006): The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 8385-8395.
- Hegedus C., Truta-Feles K., Antalffy G., Varady G., Nemet K., Ozvegy-Laczka C., Keri G., Orfi L., Szakacs G., Settleman J., Varadi A., Sarkadi B. (2012): Interaction of the EGFR inhibitors gefitinib, vandetanib, pelitinib and neratinib with the ABCG2 multidrug transporter: implications for the emergence and reversal of cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology* **84**, 260-267.
- Hegi M. E., Diserens A. C., Gorlia T., Hamou M. F., de Tribolet N., Weller M., Kros J. M., Hainfellner J. A., Mason W., Mariani L., Bromberg J. E., Hau P., Mirimanoff R. O., Cairncross J. G., Janzer R. C., Stupp R. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* **352**, 997-1003.
- Helseth A. (1995): The incidence of primary CNS neoplasms before and after computerized tomography availability. *Journal of Neurosurgery* **83**, 999-1003.
- Horwich A. L., Apetri A. C., Fenton W. A. (2009): The GroEL/GroES cis cavity as a passive anti-aggregation device. *The Federation of European Biochemical Societies Letters* **583**, 2654-2662.
- Höckel M., Vaupel P. (2001): Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* **93**, 266-276.

- Hugo H., Ackland M. L., Blick T., Lawrence M. G., Clements J. A., Williams E. D., Thompson E. W. (2007): Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of Cellular Physiology* **213**, 374–383.
- Hyafil F., Vergely C., Du Vignaud P., Grand-Perret T. (1993): *In vitro* and *in vivo* reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Research* **53**, 4595-4602.
- Jackson S. M., Manolaridis I., Kowal J., Zechner M., Taylor N. M. I., Bause M., Bauer S., Bartholomaeus R., Bernhardt G., Koenig B., Buschauer A., Stahlberg H., Altmann K. H. (2018): Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. *Nature Structural & Molecular Biology* **25**, 333-340.
- Jalan R., Olde Damink S. W. M., Hayes P. C., Deutz N. E. P., Lee A. (2004): Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *Journal of Hepatology* **41**, 613-620.
- Jiang B. H., Liu L. Z. (2009): PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in Cancer Research* **102**, 19-65.
- Jones P. M., George A. M. (2004): The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 682–699.
- Jones R. G., Thompson C. B. (2009): Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development* **23**, 537–548.
- Juliano R. L., Ling V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* **455**, 152-162.
- Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W. P. (2007): MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* **6**, 1079-1099.
- Kalidas M., Kantarjian H., Talpaz M. (2001): Chronic myelogenous leukemia. *The Journal of the American Medical Association* **286**, 895-898.
- Kamal A., Boehm M. F., Burrows F. J. (2004): Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends in Molecular Medicine* **10**, 283-290.
- Kapse-Mistry S., Govender T., Srivastava R., Yergeri M. (2014): Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Frontiers in Pharmacology* **5**, 159-181.
- Karsy M., Neil J. A., Guan J., Mahan M. A., Colman H., Jensen R. (2015): A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. *Neurosurgical Focus* **38**, E4.
- Kato H., Kato S., Kumabe T., Sonoda Y., Yoshimoto T., Kato S., Han S. Y., Suzuki T., Shibata H., Kanamaru R., Ishioka C. (2000): Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. *Clinical Cancer Research* **6**, 3937-3943.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**, 239-257.
- Khan O. A., Ranson M., Michael M., Olver I., Levitt N. C., Mortimer P., Watson A. J., Margison G. P., Midgley R., Middleton M. R. (2008): A phase II trial of lomeguatrib and temozolomide in metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer* **98**, 1614–1618.
- Kim Y. W., Sharpless E. N. (2006): The Regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **127**, 265-275.
- Kinzler K. W., Vogelstein B. (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-170.
- Koukourakis G. V., Kouloulis V., Zacharias G., Papadimitriou C., Pantelakos P., Mavrelis G., Fotineas A., Beli I., Chaldeopoulos D., Kouvaris J. (2009): Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceutical considerations and efficacy; a review article. *Molecules* **14**, 1561-1577.
- Kovacic P., Thurn L. A. (2005): Cardiovascular toxicity from the perspective of oxidative stress, electron transfer, and prevention by antioxidants. *Current Vascular Pharmacology* **3**, 107-117.
- Kregel K. C. (2002): Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* **5**, 2177-2186.

- Krex D., Klink B., Hartmann C., von Deimling A., Pietsch T., Simon M., Sabel M., Steinbach J. P., Heese O., Reifenberger G., Weller M., Schackert G. (2007): Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* **130**, 2596-2606.
- Krishnan S., Wade R., Moorman A. V. (2010): Temporal changes in the incidence and pattern of central nervous system relapses in children with acute lymphoblastic leukaemia treated on four consecutive Medical Research Council trials, 1985-2001. *Leukemia* **24**, 450-459.
- Kunjachan S., Rychlik B., Storm G., Kiessling F., Lammers T. (2013): Multidrug resistance: physiological principles and nanomedical solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 1852-1865.
- Lane D. P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.
- Lanzetta G., Minniti G. (2010): Treatment of glioblastoma in elderly patients: an overview of current treatments and future perspective. *Tumori* **96**, 650-658.
- Lee S. Y., Liu S., Mitchell R. M., Slagle-Webb B., Hong Y. S., Sheehan J. M., Connor J. R. (2011): HFE polymorphisms influence the response to chemotherapeutic agents via induction of p16INK4A. *International Journal of Cancer* **129**, 2104-2114.
- Legler J. M., Gloeckler L. A., Smith M. A., Warren J. L., Heineman E. F., Kaplan R. S., Linet M. S. (1999): Brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 1382-1390.
- Levine B., Kroemer G. (2008): Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42.
- Li J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K., Bose S., Wang S. I., Puc J., Miliareis C., Rodgers L., McCombie R., Bigner S. H., Giovanella B. C., Ittmann M., Tycko B., Hibshoosh H., Wigler M. H., Parsons R. (1997): Pten, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1948-1947.
- Li X. Q., Li J., Shi S. B., Chen P., Yu L. C., Bao Q. L. (2009): Expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 as prognostic factors in non-small cell lung cancer patients receiving postoperative cisplatin-based chemotherapy. *The International Journal of Biological Markers* **24**, 230-237.
- Li X., Wu Ch., Chen N., Gu H., Yen A., Cao L., Wang L. (2016): PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* **7**, 33440-33450.
- Linet M. S., Ries L. A., Smith M. A., Tarone R. E., Devesa S. S. (1999): Cancer surveillance series: Recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 1051-1058.
- Linzer D. I., Maltzman W., Levine A. J. (1979): The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology* **98**, 308-318.
- López-Lázaro M. (2009): Role of oxygen in cancer: looking beyond hypoxia. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* **9**, 517-525.
- Louis D. N. (2006): Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease* **1**, 97-117.
- Lowe S. W., Cepero E., Evan G. (2004): Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-315.
- Ludlum D. B. (1990): DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal. *Mutation Research* **233**, 117-126.
- Lynch D. H., Ramsdell F., Alderson M. R. (1995). Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunology Today* **16**, 569-574.
- Mačák J., Mačáková J., Dvořáčková J. (2012): Rozdělení nádorů podle původu (histogeneze). In: *Patologie*. Vol. 2, (Neužil L.), Grada Publishing a. s., Praha, 128-142.
- Madajewicz S., Chowhan N., Tfayli A., Roque C., Meek A., Davis R., Wolf W., Cabahug C., Roche P., Manzione J., Iliya A., Shady M., Hentschel P., Atkins H., Braun A. (2000): Therapy for patients with high grade astrocytoma using intra-arterial chemotherapy and radiation therapy. *Cancer* **88**, 2350-2356.
- Mamo A., Baig A., Azam M. Rho Y. S., Sahebjam S., Muanza T., Owen S., Petrecca K., Quiot M. C., Al-Shami J., Sharma R., Kavan P. (2016) Progression pattern and adverse events with bevacizumab in glioblastoma. *Current Oncology* **23**, 468-471.
- Mao Q., Unadkat J. D. (2015): Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport – an update. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* **17**, 65-82.

- Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. (2007): Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer* **7**, 961–967.
- Mayo L. D., Dixon J. E., Durden D. L., Tonks N. K., Donner D. B. (2002): PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 5484–5489.
- McLendon R., Friedman A., Bigner D. *et al.* (2008): Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068.
- Mecca C., Giambanco I., Donato R., Arcuri C. (2018): Targeting mTOR in glioblastoma: rationale and preclinical/clinical evidence. *Disease Markers* **18**, 1-10.
- Medina R. A., Gareth I. O. (2002): Glucose transporters expression, regulation and cancer. *Biological Research* **35**, 9-26.
- Micalizzi D. S., Farabaugh S. M., Ford, H. L. (2010): Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **15**, 117–134.
- Miller D. W., Kabanov A. V. (1999): Potential applications of polymers in the delivery of drugs to the central nervous system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces on Science Direct* **16**, 321–330.
- Miller D. S. (2015): Regulation of ABC transporters at the blood-brain barrier. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **97**, 395-403.
- Millson S. H., Truman A. W., Racz A., Hu B., Panaretou B., Nuttall J., Mollapour M., Söti C., Pipier P. W. (2007): Expressed as the sole Hsp90 of yeast, the alpha and beta isoforms of human Hsp90 differ with regard to their capacities for activation of certain client proteins, whereas only Hsp90 beta generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* **274**, 4453–4463.
- Miwa K., Shinoda J., Yano H., Okumura A., Iwama T., Nakashima T., Sakai N. (2004): Discrepancy between lesion distributions on methionine PET and MR images in patients with glioblastoma multiforme: insight from a PET and MR fusion image study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **75**, 1457-1462.
- Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., Brangi M., Greenberger L., Dean M., Fojo T., Bates S. E. (1999): Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Research* **59**, 8–13.
- Mizushima N. (2007): Autophagy: process and function. *Genes & Development* **21**, 2861–2873.
- Morales P. G., Carrasco-García E., Ruiz-Rico P., Martínez-Mira R., Menéndez-Gutiérrez M. P., Ferragut J. A., Saceda M., Martínez-Lacaci I. (2007): Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G2/M arrest in glioblastoma cell lines. *Oncogene* **26**, 7185-7193.
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63.
- Munoz M., Henderson M., Haber M., Norris M. (2007): Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **59**, 752–757.
- Nakamoto H., Vigh L. (2007): The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 294-306.
- Natarajan K., Xie Y., Baer M. R., Ross D. D. (2012): Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology* **83**, 1084–1103.
- Navas-Acién A., Pollán M., Gustavsson P., Floderus B., Plato N., Dosemeci M. (2002): Interactive effect of chemical substances and occupational electromagnetic field exposure on the risk of gliomas and meningiomas in Swedish men. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **11**, 1678-1683.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: <http://www.nccn.org/index.asp> (13. 11. 2018).
- Neckers L., Schulte T. W., Mimmaugh E. (1999): Geldanamycin as a potent anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. *Investigational New Drugs* **17**, 361–373.

- Neyns B., Sadones J., Joosens E., Bouttens F., Verbeke L., Baurain J. F., D'Hondt L., Strauven T., Chaskis C., In't Veld P., Michotte A., De Greve J. (2009): Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Annals of Oncology* **20**, 1596-1603.
- Ni Z., Bikadi Z., Rosenberg M. F., Mao Q. (2010): Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Current Drug Metabolism* **11**, 603–617.
- Norris C. E., Brown M. A., Hickey E., Weber L. A., Hightower L. E. (1997): Low-molecular-weight heat shock proteins in adersert fish (*Poeciliopsis lucida*): homologs of human Hsp27 and Xenopus Hsp30. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 1050–1061.
- Onconet: <http://www.onconet.cz/index.php?pg=narodni-onkologicky-program--zpravy-a-studie-o-ceske-onkologii&aid=981> (15. 3. 2019).
- O'Reilly K. E., Rojo F., She Q. B., Solit D., Mills G. B., Smith D., Lane H., Hofmann F., Hicklin D. J., Ludwig D. L., Baselga J., Rosen N. (2006): mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research* **66**, 1500–1508.
- Pardridge W. M. (2005): The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* **2**, 3-14.
- Parkin D. M. (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *The Lancet Oncology* **2**, 533-543.
- Parsons D. W., Jones S., Zhang X., Lin J. Ch., Leary R. J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I. M., Gallia G. L., Olivi A., McLendon R., Rasheed B. A., Keir S., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Busam D. A., Tekleab H., Diaz L. A., Hartigan J., Smith D. R., Strausberg R. L., Nagahashi Marie S. K., Shinjo S. M. O., Yan H., Riggins G. J., Bigner D. D., Karchin R., Papadopoulos N., Parmigiani G., Vogelstein B., Velculescu V. E., Kinzler K. W: (2008): An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807–1812.
- Paul C., Simon S., Gibert B., Viot S., Manero F., Arrigo A. P. (2010): Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27). *Experimental Cell Research* **316**, 1535-1552.
- Paul-Samojedny M., Suchanek R., Borkowska P., Pudelko A., Owczarek A., Kowalczyk M., Machnik G., Fila-Danilow A., Kowalski J. (2014): Knockdown of *AKT3 (PKB γ)* and *PI3KCA* suppresses cell viability and proliferation and induces the apoptosis of glioblastoma multiforme T98G cells. *BioMed Research International* **2014**, 768181-768192.
- Pauwels E. K., Erba P. A., Kostkiewicz M. (2007): Antioxidants: a tale of two stories. *Drug News & Perspectives* **20**, 579-585.
- Pearl L. H., Prodromou C. (2006): Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual Review of Biochemistry* **75**, 271-294.
- Peereboom D. M., Shepard D. R., Ahluwalia M. S., Brewer C. J., Agarwal N., Stevens G. H., Suh J. H., Toms S. A., Vogelbaum M. A., Weil R. J., Elson P., Barnett G. H. (2010): Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* **98**, 93-99.
- Peng H., Dong Z., Qi J., Yang Y., Liu Y., Li Z., Xu J., Zhang J. T. (2009): A novel two mode-acting inhibitor of ABCG2-mediated multidrug transport and resistance in cancer chemotherapy. *Plos One* **4**, 5676-5685.
- Perez-Gracia J. L., Labiano S., Rodriguez-Ruiz M. E., Sanmamed M. F., Melero I. (2014): Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Current Opinion in Immunology* **27**, 89–97.
- Pérez-Santonja J. J., Campos-Molla E., Lledó-Riquelme M., Javaloy J., Alió J. L. (2010): Inhibition of corneal neovascularization by topical bevacizumab (Anti-VEGF) and Sunitinib (Anti-VEGF and Anti-PDGF) in an animal model. *American Journal of Ophthalmology* **150**, 519-528.
- Peters K. B., Lou E., Desjardins A., Reardon D. A., Lipp E. S., Miller E., Herndon J. E., McSherry F., Fridman H., Vredenburgh J. (2015): Phase II trial of upfront bevacizumab, irinotecan, and temozolomide for unresectable glioblastoma. *Oncologist* **20**, 727-728.
- Pichlmeier U., Bink A., Schackert G., Stummer W., the ALA Glioma Study Group (2008): Resection and survival in glioblastoma multiforme: An RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro-Oncology* **10**, 1025-1034.

- Plasschaert S. L., de Bont E. S., Boezen M., vander Kolk D. M., Daenen S. M., Faber K. N., Kamps W. A., de Vries E. G., Vellenga E. (2005): Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research* **11**, 8661–8668.
- Qian B. Z., Pollard J. W. (2010): Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51.
- Raza A., Franklin M. J., Dudek A. Z. (2010): Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *American Journal of Hematology* **85**, 593–598.
- Redzic Z. (2011): Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS* **8**, 3-25.
- Reese T. S., Karnovsky M. J. (1967): Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *The Journal of Cell Biology* **34**, 207-217.
- Renan M. J. (1993): How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Molecular Carcinogenesis* **7**, 139-146.
- Ritossa F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571–573.
- Robey R. W., Pluchino K. M., Hall M. D., Fojo A. T., Bates S. E., Gottesman M. M. (2018): Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer* **18**, 452–464.
- Roe S. M., Prodromou C., O'Brien R., Ladbury J. E., Piper P. W., Pearl L. H. (1999): Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 260–266.
- Sajid A., Lusvardi S., Chufan E. E., Ambudkar S. V. (2018): Evidence for the critical role of transmembrane helices 1 and 7 in substrate transport by human P-glycoprotein (ABCB1). *PLoS One* **13**, 9-29.
- Sami A., Karsy M. (2013): Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in glioblastoma: novel therapeutic agents and advances in understanding. *Tumor Biology* **34**, 1991-2002.
- Sanson M., Marie Y., Paris S., Idbaih A., Laffaire J., Ducray F., El Hallani S., Boisselier B., Mokhtari K., Hoang-Xuan K., Delattre J. Y. (2009): Isocitrate dehydrogenase 1 Codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 4150-4154.
- Sausville E. A., Tomaszewski J. E., Ivy P. (2003): Clinical development of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin. *Current Cancer Drug Targets* **3**, 377–383.
- Sauvageot C. M., Weatherbee J. L., Kesari S., Winters S. E., Barnes J., Dellagatta J., Ramakrishna N. R., Stiles C. D., Kung A. L., Kieran M. W., Wen P. Y. (2009): Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. *Neuro-Oncology* **11**, 109–121.
- Saxena V., Hussain M. D. (2013): Formulation and *in vitro* evaluation of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric mixed micelles for glioblastoma multiforme. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* **112**, 350-355.
- Schaich M., Soucek S., Thiede C., Ehninger G., Illmer T. (2005): MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* **128**, 324–332.
- Schmalhofer O., Brabletz S., Brabletz T. (2009): E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **28**, 151–166.
- Schneider C., Sepp-Lorenzino L., Nimmegern E., Ouerfelli O., Danishefsky S., Rosen N., Harlt F. U. (1996): Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14536–14541.
- Schreiber R. D., Old L. J., Smyth M. J. (2011): Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570.
- Serlin Y., Shelef I., Knyazer B., Friedman A. (2015): Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **38**, 2-6.
- Sharom F. J. (2008): ABC multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **9**, 105–127.

- Sharp S., Workman P. (2006): Inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone: current status. *Advances in Cancer Research* **95**, 323–48.
- Shay J. W., Wright W. E. (2000): Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 72–76.
- Sherr C. J., McCormick F. (2002): The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103–112.
- Shih J. Y., Yang, P. C. (2011): The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* **32**, 1299-1304.
- Shiota M., Bishop J. L., Nip K. M., Zardan A., Takeuchi A., Cordonnier T., Beraldi E., Bazov J., Fazli L., Chi K., Gleave M., Zoubeidi A. (2013): Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancer Research* **73**, 3109-3119.
- Shityakov S., Forster C. (2013): Multidrug resistance protein P-gp interaction with nanoparticles (fullerenes and carbon nanotube) to assess their drug delivery potential: A theoretical molecular docking study. *International Journal of Computational Biology and Drug Design* **6**, 343–357.
- Sequist L. V., Gettinger S., Senzer N. N., Martins R. G., Jänne P. A., Lilenbaum R., Gray J. E., Iafrate A. J., Katayama R., Hafeez N., Sweeney J., Walker J. R., Fritz Ch., Ross R. W., Grayzel D., Engelman H. A., Borger D. R., Paez G., Natale R. (2010): Activity of IPI-504, a novel heat-shock protein 90 inhibitor, in patients with molecularly defined non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 4953-4960.
- Sinha S., Levine B. (2008): The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* **27**, 137-148.
- Skovsgaard T. (1978): Mechanism of cross-resistance between vincristine and daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Research* **38**, 4722-4732.
- Smalley S., Chalmers A. J., Morley S. J. (2014): mTOR inhibition and levels of the DNA repair protein MGMT in T98G glioblastoma cells. *Molecular Cancer* **13**, 144-155.
- Stebbins C. E., Russo A. A., Schneider C., Rosen N., Hartl F. U., Pavletich N. P. (1997): Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**, 239-250.
- Strazielle N., Ghersi-Egea J. F. (2013): Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Molecular Pharmaceutics* **10**, 1473–1491.
- Stupp R., Mason W. P., van den Bent M. J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M. J., Belanger K., Brandes A. A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R. C., Ludwin S. K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J. G., Eisenhauer E., Mirimanoff R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of medicine* **352**, 987–996.
- Stupp R., Hegi M. E., Mason W. P. van den Bent M. J., Taphoorn M. J., Janzer R. C., Ludwin S. K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K., Hau P., Brandes A. A., Gijtenbeek J., Marosi C., Vecht C. J., Mokhtari K., Wesseling P., Villa S., Eisenhauer E., Gorlia T., Weller M., Lacombe D., Cairncross J. G., Mirimanoff R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet. Oncology* **10**, 459-466.
- Stupp R., Hegi M. E., Gorlia T., Erridge S. C., Perry J., Hong Y. K., Aldape K. D., Lhermitte B., Pietsch T., Grujcic D., Steinbach J. P., Wick W., Tarnawski R., Nam D. H., Hau P., Weyerbrock A., Taphoorn M. J., Shen C. C., Rao N., Thurzo L., Herrlinger U., Gupta T., Kortmann R. D., Adamska K., McBain C., Brandes A. A., Tonn J. C., Schnell O., Wiegel T., Kim C. Y., Nabors L. B., Reardon D. A., van den Bent M. J., Hicking C., Markivskyy A., Picard M., Weller M., European Organisation for Research and Treatment of Cancer

- (EORTC); Canadian Brain Tumor Consortium; CENTRIC study team. (2014): Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* **15**, 1100-1108.
- Sudarsanam S., Johnson D. E. (2010): Functional consequences of mTOR inhibition. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **13**, 31–40.
- Sugawa N., Ekstrand A. J., James C. D., Collins V. P. (1990): Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8602-8606.
- Sydor J. R., Normant E., Pien C. S., Porter J. R., Ge J., Grenier L., Pak R. H., Ali J. A., Dembski M. S., Hudak J., Patterson J., Penders C., Pink M., Read M. A., Sang J., Woodward C., Zhang Y., Grayzel D. S., Wright J., Barrett J. A., Palombella V. J., Adams J., Tong J. K. (2006): Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI-504), an anti-cancer agent directed against Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 17408-17413.
- Talmadge J. E., Fidler I. J. (2010): AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Research* **70**, 5649–5669.
- Taspinar M., Ilgaz S., Ozdemir M., Ozkan T., Oztuna D., Canpinar H., Rey J. A., Sunguroğlu A., Castresana J. S., Ugur H. C. (2013): Effect of lomeguatrib–temozolomide combination on MGMT promoter methylation and expression in primary glioblastoma tumor cells. *Tumor Biology* **34**, 1935-1947.
- Thomas H., Coley H. M. (2003): Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* **10**, 159-165.
- Trepel J., Mollapour M., Giaccone G., Neckers L. (2010): Targeting the dynamic Hsp90 complex in cancer. *Nature Reviews Cancer* **10**, 537-549.
- Trivedi R. N., Almeida K. H., Fornsglio J. L., Schamus S., Sobol R. W. (2005): The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. *Cancer Research* **65**, 6394–6400.
- Ullah Z., Lee Y. Ch., De Pamphilis L. M. (2009): Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell division* **4**, 10-24.
- Vinter V., Králíček I. (2016): Základní obecné charakteristiky rámcových vzdělávacích programů pro čtyřletá gymnázia a vyšší stupně víceletých gymnázií. In: Začínající učitel biologie. Vol. 1, (Vinter V.), Univerzita Palackého, Olomouc, 228-245.
- Wang X., Chen J. X., Liu Y. H. You C., Mao Q. (2013): Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. *Neurological Sciences* **34**, 1421-1428.
- Wang H., Lu M., Yao M., Zhu. (2016): Effects of treatment with an Hsp90 inhibitor in tumors based on 15 phase II clinical trials. *Molecular and Clinical Oncology* **5**, 326-334.
- Wang N., Zhang Q., Ning B., Luo L., Fang Y. (2017): β -Asarone promotes Temozolomide's entry into glioma cells and decreases the expression of P-glycoprotein and MDR1. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedicine & Pharmacotherapie* **90**, 368-374.
- Warburg O. (1956a): On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314.
- Warburg O. (1956b): On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270.
- Webb C. P., Hose C. D., Koochekpour S., Jeffers M., Oskarsson M., Sausville E., Monks A., Vande Woude G. F. (2000): The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network. *Cancer Research* **60**, 342-349.
- Wegele H., Müller L., Buchner J. (2004): Hsp70-Hsp90-a relay team for protein folding. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **151**, 1-44.
- Weinberg R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323–330.
- White E., Karp C., Strohecker A. M., Guo Y., Mathew R. (2010): Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 212–217.
- Whitelock J. M., Murdoch A. D., Iozzo R. V., Underwood P. A. (1996): The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor

- by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 10079–10086.
- Whitesell L., Mimnaugh E. G., De Costa B., Myers C. E., Neckers L. M. (1994): Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8324-8328.
- Wijnholds J., Scheffer G. L., van der Valk M., van der Valk P., Beijnen J. H., Scheper R. J., Borst P. (1998): Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 797–808.
- Workman P. (2004): Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends in Molecular Medicine* **10**, 47-51.
- Wyllie A. H., Kerr J. F., Currie A. R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* **68**, 251-306.
- Yang J., Weinberg R. A. (2008): Epithelial-mesenchymal transition: At the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell* **14**, 818–829.
- Yuan T. L., Cantley L. C. (2008): PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**, 5497-5510.
- Zagzag D., Nomura M., Friedlander D. R., Blanco C. Y., Gagner J. P., Nomura N., Newcomb E. W. (2003): Geldanamycin inhibits migration of glioma cells *in vitro*: a potential role for hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) in glioma cell invasion. *Journal of Cellular Physiology* **196**, 394–402.
- Zambelli A., Poggi G., Da Prada G., Pedrazzoli P., Cuomo A., Miotti D., Perotti C., Preti P. Robustelli della Cuna G. (1998): Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Research* **18**, 4705–4708.
- Zhang W., Mojsilovic-Petrovic J., Andrade M. F., Zhang H., Ball M., Stanimirovic D. B. (2003): The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 2085-2087.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

17-AAG	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, tanespimycin
17-DMAG	17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, alvespimycin
4EBP1	translation initiation factor 4E binding protein
ABC	ATP binding cassette transporters
AMT	adsorpce zprostředkovaná transcytózou
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
ATCC	American Type Culture Collection
BCRP, ABCG2	breast cancer rezistence protein
Cdk1	cyklin-dependentní kinasa 1
<i>CDKN2A</i>	cyklin dependentní kinasový inhibitor 2A
CKI	inhibitor cyklin dependentní kinasy
CNS	centrální nervová soustava
CT	výpočetní tomografie
DMEM	<i>z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECM	extracelulární matrix
EF2	transkripční faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EMT	epiteliální-mesenchymální přechod
ERK	kinasa regulovaná extracelulárním signálem
FasL	Fas ligant
FasR	Fas receptor
FGF	fibroblastový růstový faktor
FTC	fumitremorgin C
GBM	multiformní glioblastom
GDN	geldanamycin
GDNF	<i>z angl. glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
GSH	redukovaný glutathion
GSK3 β	glykogen synthasa kinasa 3 β

HEB	hematoencefalická bariéra
HIF	hypoxia inducible factor
Hop	z angl. <i>HSP70-HSP90 organizing protein</i>
HSP	proteiny teplotního šoku
<i>IDH1/2</i>	isocitrát dehydrogenasa
IFN	interferon
IL-1 α (6, 10)	interleukin-1 α (6, 10)
IPI-504	rataspimycin
IS	imunitní systém
KO143	derivát funitremorginu C
LMB	lomeguatrib
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kinasa
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MDR	mnohočetná léková rezistence
MDR1, ABCB1, P-gp	P-glykoprotein
MEK	MAPK/ERK kinasa
MET	mezenchymální epiteliální přechod
<i>MGMT</i>	O ⁶ -methylguanin-DNA-methyltransferasa
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MLH1	mutL homolog 1
MR	magnetická rezonance
MRP1, ABCC1	multidrug resistance protein 1
MSH2	mutS protein homolog 2
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1 (2)	mTORcomplex1 (2)
MTIC	5-(3-dimethyl-1-triazenyl) imidazol-4-karboxamid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NBDs	nukleotid vázající domény
NF- κ B	nuclear factor-kappaB
NK	natural killer
Nrf2	nuclear factor-erythroid 2-related factor-2
p53	nádorový supresorový transkripční faktor
PBS	phosphate buffered saline

PDK-1	fosfatidylinositol-dependentní kinasa 1
PET	pozitronová emisní tomografie
PI3K	fosfatidylinositol (3,4,5) trisfosfát kinasa
PIP2	fosfatidylinositol-(4,5)-difosfát
PIP3	fosfatidylinositol-(3,4,5)-trifosfát
pRB	retinoblastomový protein
pS6K	ribosomální pp70S6k kinasa
<i>PTEN</i>	fosfatasa a tensin homolog
RAF	protoonkogen serin/threonin-protein kinasa
RAS	Rat sarcoma
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RIPA	pufr, z angl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RMT	receptorem zprostředkovaná transcytóza
ROS	reaktive oxygen species
RPMI	medium, z angl. <i>roswell park memorial institute</i>
RT	radiační terapie
RTK	tyrosinkinasový receptor
SH2	Src homology 2
SOS	Son of Sevenless
TGF	nádorový růstový faktor
TMDs	transmembránové domény
TMZ	temozolomid
TNF- α	tumor nekrotizující faktor- α
TLR	Toll-like receptory
<i>TP53</i>	tumor supresorový gen
TRAIL-R2	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-R2
<i>TSC1/2</i>	nádorové supresorové geny
TSP-1	thrombospondin-1
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
WHO	světová zdravotnická organizace
WT1	z angl. Wilms tumor 1
<i>XP</i>	xeroderma pigmentosum
ZSQ	zosuquidar