

Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Laboratoř růstových regulátorů



**VLIV VYBRANÝCH KOMPLEXŮ PŘECHODNÝCH KOVŮ  
NA INDUKCI AUTOFAGIE V LIDSKÝCH NÁDOROVÝCH  
BUŇKÁCH**

Diplomová práce

Autor: Bc. Michaela KUČERKOVÁ  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Vedoucí práce: Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.

Olomouc 2016

# BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Michaela Kučerková
Název práce	Vliv vybraných komplexů přechodných kovů na indukci autofagie v lidských nádorových buňkách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biofyziky Univerzity Palackého Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Hlavním tématem této diplomové práce je autofagie. Za normálních podmínek se autofagie podílí na udržení buněčné homeostázy organismu. Deregulace autofagie ale může vést až ke vzniku mnoha onemocnění, včetně nádorových. Některé studie také naznačují, že autofagie hraje důležitou roli při vývoji rezistence nádorových buněk k látkám používaným v protinádorové terapii. Právě získaná chemorezistence nádorových buněk má často za následek selhání léčby při použití metalofarmak na bázi platiny. Přesná role autofagie během tumorigeneze a ve vývoji rezistence však není zcela známá. Proto studium autofagie hraje v současné době ve výzkumu léčby rakoviny významnou roli.</p> <p>V rámci teoretické části této diplomové práce jsou shrnuty základní molekulární mechanismy autofagie, možnosti její regulace a její úloha při vzniku získané rezistence nádorových buněk k metalofarmakům na bázi platiny. Okrajově jsou zde také zmíněny ostatní typy buněčné smrti – apoptóza a nekróza. Experimentální část se pak věnuje vlivu cisplatinu na úroveň exprese proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B, které jsou zapojeny do autofagické odpovědi v buňkách lidského ovariálního karcinomu citlivých k cisplatině a se získanou rezistencí k této látce.</p>
Klíčová slova	Autofagie, buňky lidského ovariálního karcinomu A2780, cisplatina, rezistence
Počet stran	45
Jazyk	Český

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Michaela Kučerková
Title of thesis	Effect of selected transition metal based complexes on autophagy induction in human cancer cells
Type of thesis	Master
Department	Department of Biophysics
Supervisor	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>The main topic of this thesis is autophagy. In normal conditions, autophagy contributes to maintain cellular homeostasis. Deregulation of autophagy can lead to the development of many diseases, including a cancer. Some studies suggest that autophagy plays an important role in the development of drug resistance in cancer cells. The chemoresistance of cancer cells leads to failure of the treatment with platinum based metallodrugs. The exact role of autophagy during tumorigenesis and in the development of drug resistance is not clear. Therefore, the study of autophagy plays an important role in carcinoma treatment research.</p> <p>The teoretical part of this thesis summarizes the basic molecular mechanism of autophagy, the possibilities of autophagy regulation and the role of autophagy in the development of tumor cells resistance during the treatment with platinum based metallodrugs. The other types of cell death – apoptosis and necrosis are described in this work as well. Experimental part of this thesis deals with the influence of cisplatin on the expression levels of autophagy protein markers, Beclin-1 and LC3-II A/B, in ovarian cancer cells sensitive and resistant to cisplatin.</p>
Keywords	Autophagy, human ovarian carcinoma cells A2780, cisplatin, resistance
Number of pages	45
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením Mgr. Jitky Prachařové, Ph.D. s použitím citované literatury.

V Olomouci, 27. 4. 2016

.....

Podpis

Na tomto místě bych především chtěla poděkovat vedoucí práce Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a zvláště za velkou ochotu a vstřícnost během vypracování celé této práce. Tato práce byla podpořena studentským grantovým projektem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA PřF 2016\_013).

# OBSAH

Seznam zkratk.....	7
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>10</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
3.1 Programovaná buněčná smrt.....	11
3.2 Autofagie.....	16
3.2.1 Typy autofagie.....	16
3.2.2 Průběh autofagie v savčích buňkách.....	18
3.3 Autofagie a nádorová onemocnění.....	20
3.3.1 Regulace autofagie v nádorových buňkách.....	20
3.3.2 Autofagie a apoptóza.....	23
3.3.3 Role autofagie v rezistenci k protinádorové terapii.....	24
3.4 Cisplatina a její analoga.....	24
3.4.1 Mechanismus biologického účinku cisplatiny.....	25
3.4.2 Rezistence buněk k cisplatině.....	25
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>27</b>
4.1 Materiál a metody.....	27
4.1.1 Biologický materiál a chemikálie.....	27
4.1.2 Použité roztoky a gely.....	28
4.1.3 Metody.....	30
MTT test buněčné viability.....	30
Příprava proteinových extraktů.....	31
Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích.....	31
SDS-PAGE.....	31
Imunodetekce vybraných proteinů.....	32
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>34</b>
5.1 MTT test.....	34
5.2 SDS-PAGE a Western blot.....	35
5.3 Imunodetekce vybraných proteinů.....	36
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>7 POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>43</b>

## SEZNAM ZKRATEK

AA	Akrylamid
AMPK	Adenosinmonofosfátová kináza
APS	Persíran amonný
Atg	Geny specifické pro autofagii (Autophagy-related genes)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BECN1	Beclin-1, BH3-only Bcl-2 protein
BH	Bcl-2 homologní doména
BisAA	Bisakrylamid
BSA	Hovězí sérový albumin
cDDP	Cis-diamindichloroplatnatý komplex
ciAP	Inhibitor apoptických proteinů (Cellular inhibitor of apoptosis)
DAPK	Death-associated protein kinase
DISC	Smrt-indukující signální komplex (Death-inducing signaling complex)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRAM	Damage-regulated autophagy modulator
ECD	Evolučně konzervovaná doména
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
ERK1	Extracellular signal-regulated kinase 1
FADD	Fas-associated death domain protein
FBS	Fetální hovězí sérum
FIP200	Focal adhesion kinase family integrating protein
FoxO	Forkhead box O
HIF1 $\alpha$	$\alpha$ podjednotka hypoxií indukovatelný faktor 1 (Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ )
HIF1	Hypoxií indukovatelný faktor 1 (Hypoxia-inducible factor 1)
HMG box	High mobility group box
Hsc-70 protein	Heat shock 70 kDa protein 8
IC <sub>50</sub>	Inhibiční koncentrace látky, která způsobí usmrcení 50% buněk
IGF-1	Inzulín-like růstový faktor-1
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL-1	Interleukin 1
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
LAMP2a	Lysozomální s membránou asociovaný protein 2a (Lysosome-associated membrane protein 2a)
LC3	Lehký řetězec 3 (Light chain 3)
LKB1	Liver kinase B1
LSB 2x	Laemmliho nanášecí pufr 2x
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinová kináza (Mitogen-activated protein kinases)
MEK1/2	Mitogenem aktivované proteinové kinázy 1/2 (Mitogen-activated protein kinase kinase)
MOMP	Permeabilita vnější mitochondriální membrány (Mitochondrial outer membrane permeabilization)

MRP proteiny	Multidrug resistance-associated proteins
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
mTOR	Mammalian target of rapamycine
mTOR1/	mTOR kináza třídy 1/2
NF- $\kappa$ B	Nukleární faktor kappa B
NGF	Nervový růstový faktor
NP-40	Nonidet-P40 pufr
Par-6	Prostate apoptosis response-6
PARP1	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 1 (Poly (ADP-ribose) polymerase 1)
PAS	Pre-autofagozomová struktura
PB1 doména	Protein vázající doména 1 (Protein binding domain)
PBS 10x	Fosfátový pufr 10x
PCD I/II	Programovaná buněčná smrt typu I./II.
PE	Fosfatidylethanolamin
PI3K	Fosfatidylinositol-3-fosfát kináza
PI(3)P	Fosfatidylinositol-3-fosfát
PI(4,5)P2	Fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfát (Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate)
PIP3	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfát (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)
PKC	Proteinová kináza C (Protein kinase C)
PVDF	Polyvinyl difluoridová membrána
Raf	Ras-associated factor
Ras	Rous adenosarcoma
RIP1 a 3	Receptor interagující proteinové kinázy 1 a 3 (Receptor-interacting protein 1 and 3)
ROS	Reaktivní forma kyslíku (Reactive oxygen species)
Rubicon	RUN domain Beclin-1-interacting cysteine-rich-containing
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TBS 10x	Tris pufr 10x
TBST	Tris pufr s Tween 20
TEMED	N,N,N',N' - tetrametylendiamin
TNFR	Receptor tumor nekrotického faktoru (Tumor necrosis factor receptor)
TNF $\alpha$	Tumor nekrotický faktor $\alpha$ (Tumor necrosis factor $\alpha$ )
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
TRAIL	Apoptózu indukující ligand spojený s TNF (Tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand)
TRIS	Tris-(hydroximethyl)-aminomethan
TSC1/2	Komplex 1/2 tuberózní sklerózy (Tuberous sclerosis complex 1/2)
ULK1	Unc-51-like kináza 1 (Unc-51-like kinase 1)
UVRAG	UV radiation resistance associated gene
Vps34	Vezikulární protein třídění 34 (Vesicular protein sorting 34)



# 1 ÚVOD

Pojem autofagie pochází z řeckého „auto“ tedy sám, a „phagy“ neboli jíst. Autofagie představuje složitý evolučně konzervovaný proces degradace buněčných komponent vyskytující se u všech eukaryotických buněk. Poprvé byla popsána v roce 1963 belgickým biologem Christianem de Duve (de Duve Ch., 1967). Až na malé rozdíly probíhá autofagie u všech eukaryot podobně. Nejdříve jsou částice určené k degradaci postupně obkloповány dvouvrstvou membránou, tzv. fagoforem. Jakmile dojde k úplnému uzavření částic, vznikne struktura označovaná jako autofagozom. Splynutím autofagozomu s lysozomem vznikne autofagolysozom, ve kterém probíhá samotná degradace částic.

Za normálních podmínek slouží autofagie především k rozkladu nukleových kyselin a proteinů nebo k odstranění poškozených či nadbytečných organel a je tedy nezbytným dějem pro udržení buněčné homeostázy. Funguje také jako adaptační mechanismus umožňující buňce přežít za stresových podmínek jako je např. nedostatek živin, hypoxie a vysoká teplota. Nedostatečná nebo naopak nadměrná úroveň autofagie může vyústit až v narušení důležitých buněčných funkcí, což má za následek vznik mnoha onemocnění, včetně nádorových (Levine B., 2004; Mizushima N., 2011).

Některé studie také naznačují, že autofagie hraje důležitou roli při vývoji rezistence nádorových buněk k látkám používaným v protinádorové terapii. Právě získaná chemorezistence nádorových buněk má často za následek selhání léčby při použití metalofarmak na bázi platiny (Siddik Z. H., 2003). Metalofarmaka na bázi platiny jsou využívána k léčbě rakoviny již mnoho let. V praxi se především využívá cisplatina (*cis*-diamindichloroplatnatý komplex, cDDP) a také její přímý analog karboplatina (Brabec V., 1998). Přesná role autofagického procesu ve vývoji rezistence však není zcela známa. Proto studium autofagie hraje v současné době ve výzkumu léčby rakoviny významnou roli.

V rámci diplomové práce byl zkoumán vliv cisplatiny na úroveň exprese proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B, zapojených do autofagické odpovědi v buňkách lidského ovariálního karcinomu A2780. Proteinové profily buněk A2780 citlivých k cisplatině byly srovnány s hladinami exprese proteinů u linie se získanou rezistencí k této látce. Získané výsledky jsou diskutovány s nejnovějšími poznatky dostupnými v odborné literatuře a dopomohou k pochopení role autofagie ve vývoji rezistence nádorových buněk k cisplatině.

## **2 CÍLE PRÁCE**

1. Shromáždit nejnovější data týkající se studované problematiky.
2. Zpracovat literární rešerši na dané téma.
3. Zvládnout techniku práce s kulturami lidských nádorových buněk.
4. Studovat vliv cisplatinu na úroveň exprese proteinů zapojených do autofagické dráhy.

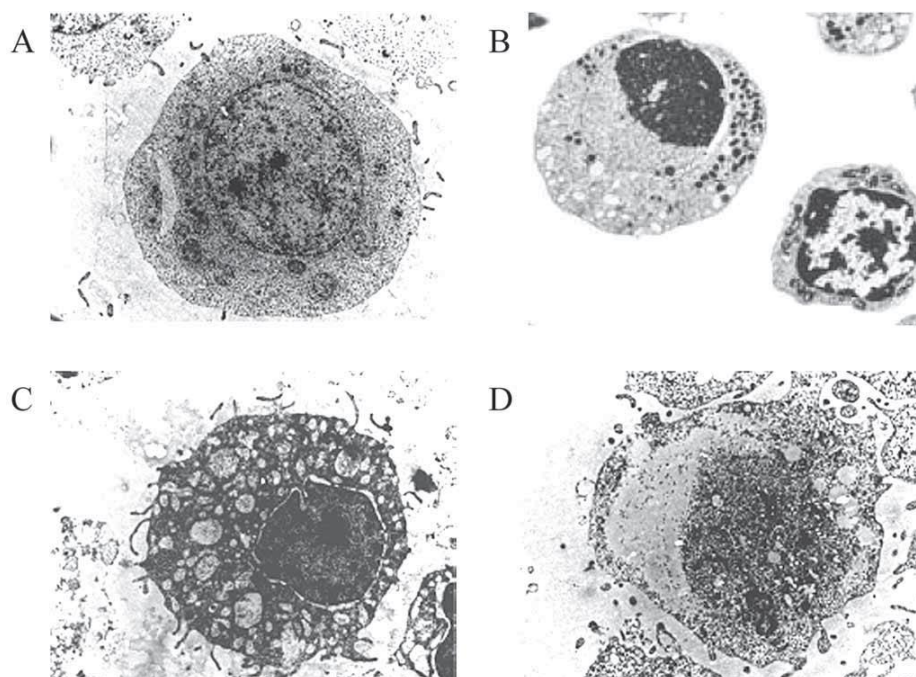
### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Programovaná buněčná smrt

Programovaná buněčná smrt představuje intracelulární kaskádu signálních drah vedoucí k odbourání cytoskeletu, fragmentování jaderné DNA a destrukci buňky. Jde o regulovatelný děj, který může být vyvolán různými podněty, jak intracelulárními (poškození DNA), tak extracelulárními (různé formy stresu, virové a bakteriální infekce). Za normálních okolností slouží programovaná buněčná smrt k udržení homeostázy organismu, kdy jsou její pomocí odstraněny staré, poškozené nebo nadbytečné buňky. V průběhu embryonálního vývoje je také zodpovědná např.: za vývoj dutých orgánů nervového a kardiovaskulárního systému, prstů atd. Naopak poruchy programované buněčné smrti mají za následek narušení homeostázy, která může vést až k poškození organismu a závažným onemocněním (Weil M., 1997).

Nejstarší klasifikace buněčné smrti je založena na pozorování morfologie umírajících buněk pod mikroskopem. Porozumění molekulární dráze vedoucí k regulaci a provedení buněčné smrti, přispělo k rozvoji klasifikace jednotlivých typů smrti podle biochemických kritérií. V dnešní době se však stále používá morfologická klasifikace spíše než klasifikace založená na biochemických kritériích. Podle morfologie lze programovanou buněčnou smrt rozdělit na apoptózu, nekrózu a autofagii (Galluzzi L., 2012). Na obrázku 1 je pomocí elektronového mikroskopu zachycena typická morfologie buněk v apoptóze, nekróze a autofagii společně s buňkou s normální morfologií.

Kromě morfologických znaků lze buněčnou smrt také rozdělit na fyziologickou, patologickou, programovanou a náhodnou (Galluzzi L., 2012).



Obr. 1 - Morfologie normální buňky (A), buňky v apoptóze (B), autofagii (C) a nekróze (D); pořízeno elektronovým mikroskopem, zvětšení 4 400x (převzato z: Ondrušková E., 2014)

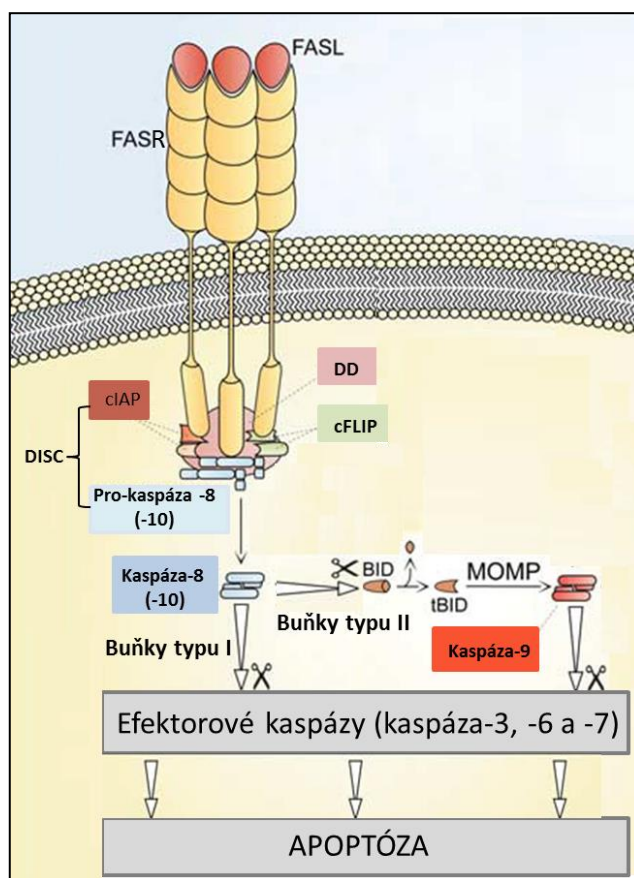
## Apoptóza

Apoptóza je označována jako programovaná buněčná smrt I. typu (PCD I). Pojem apoptóza poprvé zmiňuje ve svém článku John F. Kerr na začátku 70. let 20. století (Kerr J. F., 1972). Tento termín pochází z řeckého apoptosis, neboli padání. U apoptotické buňky (Obr. 1 – B) dochází ke kondenzaci a následné fragmentaci jaderného chromatinu. Cytoplazma je více koncentrovaná a buňka zmenšuje svůj objem. Cytoplazmatická membrána vytváří nepravidelné výběžky a buňka se rozpadá na tzv. apoptotická tělíška. Díky molekulám fosfatidylserinu na svém povrchu, jsou apoptická tělíška rozpoznávána buňkami imunitního systému a následně fagocytována (Kerr J. F., 1972). Na rozdíl od nekrózy tento proces nevyvolává zánětlivou reakci organismu.

Existují dvě hlavní signální kaskády vedoucí k aktivaci apoptózy – vnější, která je aktivována vnějšími podněty (stresovými faktory, cytokiny imunitních buněk, cytotoxickými buňkami) a vnitřní, jež je spouštěna vnitřními podněty (poškození DNA, oxidativní stres, hypoxie, nedostatek růstových signálů nebo signálů pro přežití).

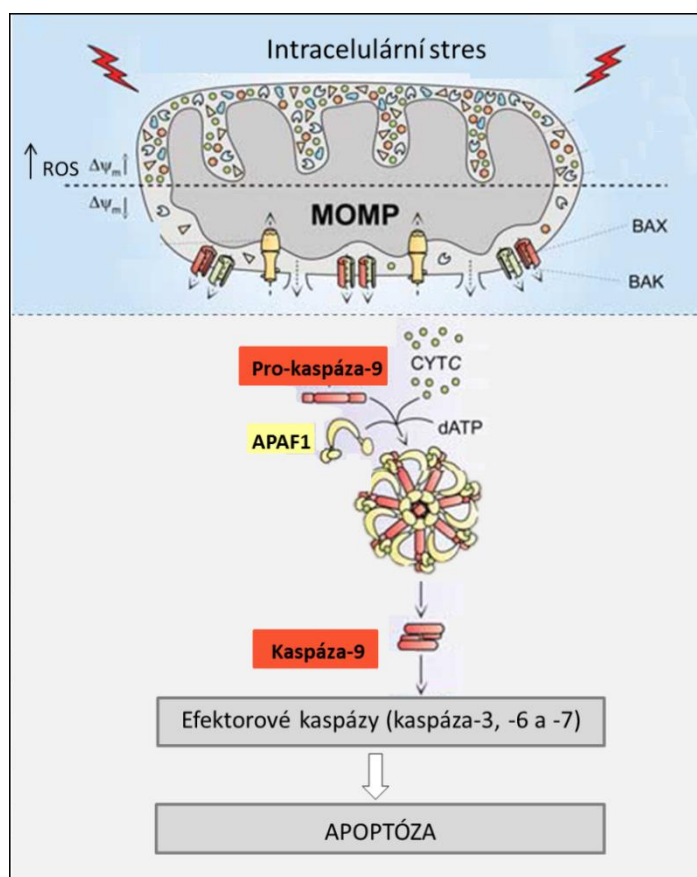
Vnější dráha (Obr. 2) je aktivována navázáním ligandů (např.: tumor nekrotického faktoru  $\alpha$  - TNF $\alpha$ , FASL a apoptózu indukujícího ligandu spojeného s TNF - TRAIL) na tzv. receptory smrti, jež se nacházejí v membráně buňky. Mezi receptory smrti patří např.: Fas receptory (FASR), receptory tumor nekrotického faktoru (TNFR) a další (Chaudhary P. M, 1997). Navázání ligandu na příslušný receptor vede k aktivaci cytoplazmatické domény receptoru a k formování smrt-indukujícího signálního komplexu (DISC). Tento komplex je složen z adaptorového proteinu, který se podílí na přenosu signálu, domény smrti (FADD, TRADD) transdukující signál, dále inhibitorů apoptických proteinů (cIAP), cFLIP a prokaspázy-8 nebo -10. Prokaspázy představují nereaktivní formy kaspáz štěpících proteiny. Dimerizací prokaspáz dochází k jejich aktivaci. Aktivovaná kaspáza-8, respektive kaspáza-10, pak u buněk typu I štěpí efektorové kaspázy-3, -6 a -7, které spouští apoptózu. U buněk typu II kaspáza-8 štěpí pro-apoptické BH3-only proteiny (např.: Bid, Bim, Noxa, Puma). Jejich rozštěpením je změněna permeabilita vnější mitochondriální membrány (MOMP), jež následně umožňuje uvolnění cytochromu-c z mitochondrie a tím aktivuje vnitřní apoptickou dráhu (Scaffidi C., 1998; Galluzzi L., 2012).

U buněk typu I je tedy k aktivaci apoptózy dostačující navázání ligandu na receptor smrti a aktivace prokaspázy. U buněk typu II je důležitá úloha mitochondrií, neboť ztrátou membránového potenciálu mitochondrií dochází k aktivaci kaspáz a uvolnění cytochromu c (Scaffidi C., 1998).



Obr. 2 – Vnější dráha apoptózy (převzato z Galluzzi L., 2012 a upraveno)

O zahájení vnitřní dráhy apoptózy (Obr. 3) rozhoduje kontrolní mechanismus mitochondrií. Pokud dojde k akumulaci stresových faktorů v buňce (např.: hypoxie, poškození DNA, atd.), změní se permeabilita vnější mitochondriální membrány. Vyčerpání mitochondriálního potenciálu vede k zastavení syntézy ATP, inhibici respiračního řetězce a nadbytku reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou neslučitelné se životem buňky. Vnitřní dráha apoptózy může být také spuštěna cestou, ve které hrají hlavní úlohu kaspázy. Změna permeability vnější membrány, která je způsobena otevřením Bax/Bak kanálů, umožní uvolnění cytochromu c do cytosolu. Cytochrom c se za přítomnosti dATP spojí s proteinem Apaf-1 a prokaspázou-9 a společně vytvoří komplex tzv. apoptozom. Štěpením prokaspázy-9 vzniká její aktivní forma – kaspáza-9, která dále štěpí kaspázu-3, -6 a -7 a tímto aktivuje apoptózu (Zou H., 1997; Gross A., 1998; Ouyang L., 2012; Galluzzi L., 2012).



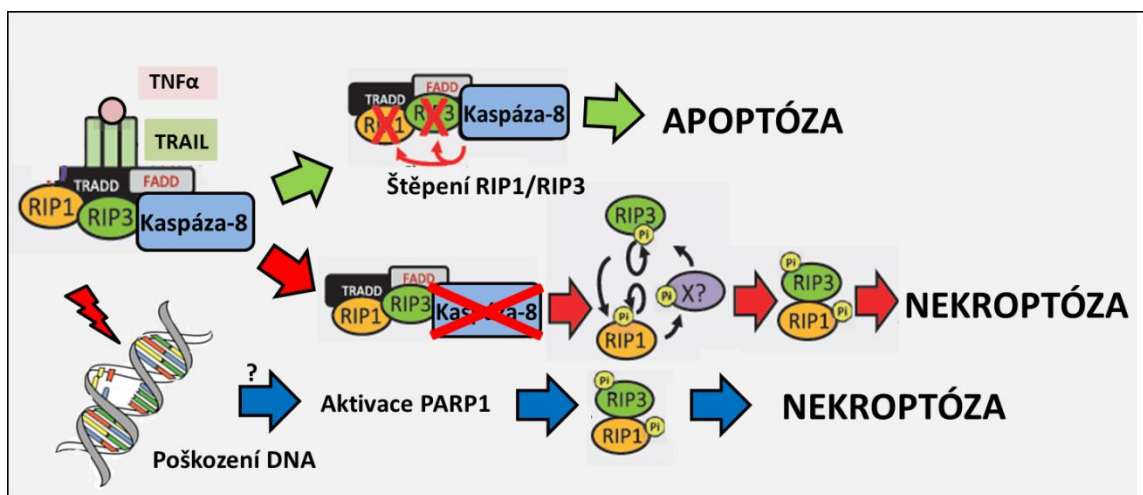
Obr. 3 – Vnitřní dráha apoptózy (převzato z Galluzzi L., 2012 a upraveno)

## Nekróza

Dalším typem buněčné smrti je nekróza. Nekróza nastává u buněk, které nejsou schopny udržet homeostázu, čímž dochází ke ztrátě celistvosti plazmatické membrány a vylití buněčného obsahu do okolí (Obr. 1 – D). Uvolněné enzymy pak poškozují okolní buňky a dochází k vytvoření zánětu. Kromě patologického účinku na organismus, má nekróza i fyziologickou funkci. Slouží například jako obranný mechanismus organismu při virových infekcích nebo při usmrcení nádorových buněk, u kterých vlivem mutace došlo k inaktivaci apoptické dráhy (Dvorská M., 2008; Ondrušková E., 2014).

Po dlouhou dobu byla nekróza považována za náhodný a neregulovatelný proces. Nedávné studie ale prokázaly existenci specifických signálních drah vedoucích k aktivaci nekrózy (Cho S. Y., 2009; He S., 2009). Tento regulovaný způsob nekrózy byl pojmenován jako nekroptóza (Obr. 4). K iniciaci programované nekroty dochází navázáním ligandů smrti (TNF $\alpha$ , TRAIL, FASL) na příslušný receptor, stejně jako je tomu u apoptózy. Cytoplazmatická část receptoru obsahuje doménu smrti (TRADD, FADD), receptor interagující proteinové kinázy 1 a 3 (RIP1 a 3) a kaspázu-8 nebo -10. Všechny tyto části vytváří komplex 2. Za normální situace kaspáza-8 (-10) štěpí RIP1 a RIP3 a je spuštěna signální kaskáda vedoucí k apoptóze. Za patologické situace, kdy není přítomna kaspáza-8 a -10 nebo když jsou kaspázy inhibovány léky, dochází k deubiquitinaci RIP1. Kináza RIP1 dále interaguje se svým homologem RIP3. RIP1 a RIP3 se vzájemně fosforylují, čímž se aktivuje nekroptóza (Vandenabeele P., 2010; Li J., 2012; Tsuda H., 2012). Regulovaná nekroty může být také aktivována poškozením DNA, kdy je zatím neznámou dráhou aktivována poly(ADP-ribóza) polymeráza 1 (PARP1). PARP1 se poté

podílí na spojení RIP1 s RIP3 a jejich fosforylaci, čímž je spuštěn proces nekroptózy (Vanlangenakker N., 2011; Galluzzi L., 2012).



Obr. 4 – Regulovaná nekróza, neboli nekroptóza (převzato z Tsuda H., 2012 a upraveno)

Posledním typem buněčné smrti z hlediska morfologické klasifikace je autofagie, která je také označována jako programovaná buněčná smrt II. typu (PCD II). Jelikož je studium autofagie ústředním tématem této práce, je tomuto typu buněčné smrti podrobněji věnována následující kapitola 3.2.

Neméně důležité jsou další typy buněčné smrti, jako je např.: anoikis, ke které dochází při nesprávném kontaktu buněk s mezibuněčnou hmotou. Pyroptóza slouží zase jako ochrana při napadení buňky imunitního systému patogeny. Excitotoxicita je velmi významným mechanismem smrti neuronů při výskytu vysokých koncentrací glutamátu (Pláteník J., 2015). Wallerova degenerace se rozvíjí při poranění neuronu, kdy dochází k fragmentaci axonu a myelinu (Kaiser R., 2012; Ondrušková E., 2014). K mitotické katastrofě dochází při poškození mitotického aparátu v průběhu mitotického dělení buňky. Paraptóza je způsobena nadměrnou aktivitou enzymu poly(ADP-ribózy) polymerázy 1, která vede k poškození DNA. Vyskytuje se u mrtvice, diabetes, zánětu a neurodegenerativních onemocnění. Entóza představuje zvláštní typ buněčné smrti, kdy je buňka po ztrátě kontaktu s podkladem celá “spolknuta” druhou buňkou. Netóza, neboli neutrofilová past, slouží k obraně organismu před mikroorganismy, které jsou chytány do pasti ze sítí neutrofilů a následně fagocytovány (Galluzzi L., 2012).



## 3.2 Autofagie

Autofagie byla poprvé popsána v roce 1963 belgickým biologem Christianem de Duve (de Duve Ch., 1967). U autofagické buňky (Obr. 1 – C) je typická přítomnost výrazných vakuol v cytoplazmě a jádra s nekondenzovaným heterochromatinem (Levine B., 2005; Galluzzi L., 2012). Pojem autofagie, pochází z řeckého „auto“ tedy sám, a „phagy“ neboli jíst. Vystihuje proces degradace vlastních buněčných komponent, které jsou pomocí lysozomu rozloženy a následně znovu využity. Autofagickými lysozomy jsou odstraněny větší částice, např.: proteiny, samotné organely buňky, viry a bakterie, které jsou příliš velké na to, aby byly odstraněny proteazomy (Levine B., 2004; Mizushima N., 2011). Autofagie hraje důležitou roli v řadě fyziologických a patologických procesů. Podílí se např. na udržení buněčné homeostázy, remodelaci tkání, řízení buněčného růstu a vrozené imunitě. Funguje také jako adaptační mechanismus umožňující buňce přežít za stresových podmínek jako je např. nedostatek živin, hypoxie a vysoká teplota. Naopak nedostatečná nebo naopak nadměrná úroveň autofagie může přispět k rozvoji v některých onemocněních, včetně rakoviny, neurodegenerativních a autoimunitních poruch (Levine B., 2004; Mizushima N., 2005).

### 3.2.1 Typy autofagie

Podle mechanismu lze autofagii rozdělit na 3 typy: makroautofagii, mikroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperony (Obr. 5; Mizushima N., 2011).

#### Makroautofagie

Makroautofagie je nejvýznamnějším a také nejvíce prostudovaným typem autofagie. Během makroautofagie jsou částice určené k degradaci postupně obkloповány dvouvrstvou membránou, tzv. fagoforem. Jakmile dojde k úplnému uzavření částic, vznikne struktura označovaná jako autofagozom. Právě tvorba autofagozomu je pro makroautofagii charakteristická. Splynutím autofagozomu s lysozomem vznikne autofagolysozom, ve kterém probíhá samotná degradace částic pomocí enzymů (Glick D., 2010). Studium makroautofagie bylo předmětem této práce a dále v textu je označována pouze jako autofagie.

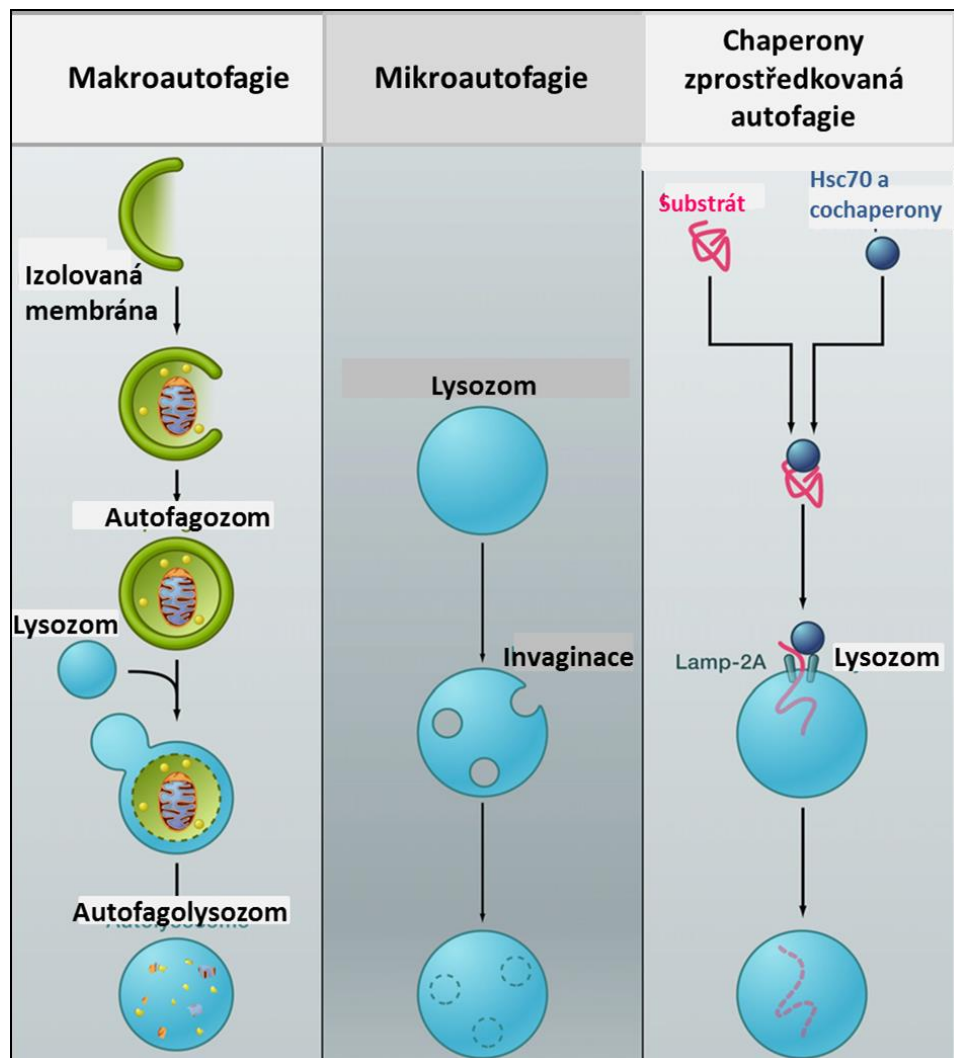
#### Mikroautofagie

U mikroautofagie jsou proteiny a částice cytozolu přímo pohlcovány vchlípením membrány lysozomu. Nedochozí u ní tedy k tvorbě autofagozomu. Pomocí mikro- i makroautofagie mohou být pohlceny velké struktury jak selektivním, tak neselektivním mechanismem (Glick D., 2010). U neselektivního způsobu degradace jsou náhodně rozkládány různé částice v cytozolu a organely. Selektivní degradace je oproti tomu přesně zaměřena na určitý typ struktur nebo organel. Zástupcem selektivní autofagie je např. mitofagie, kdy jsou degradovány mitochondrie; pexofagii jsou odstraňovány peroxizomy a u nukleofagie dochází k degradaci jádra. Dalším typem selektivní autofagie je xenofagie, pomocí níž je odstraňován cizorodý nitrobuněčný materiál, především pak viry a bakterie.



## Autofagie zprostředkovaná chaperony

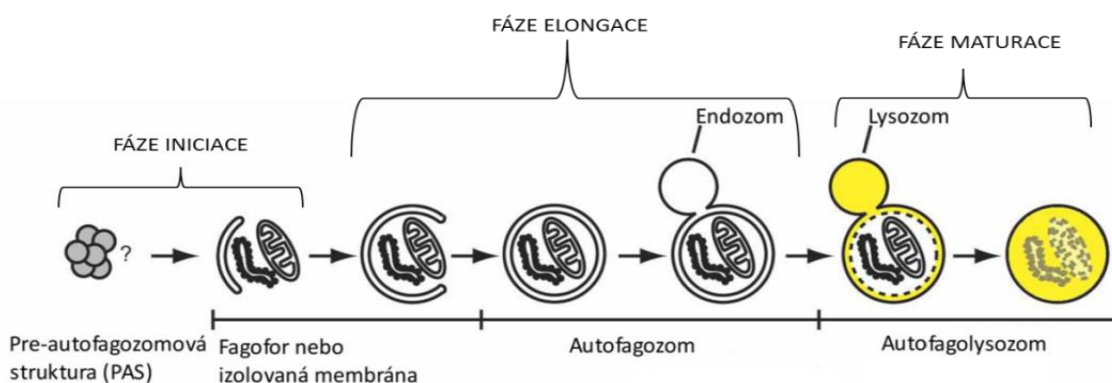
Na rozdíl od předešlých druhů autofagie, nedochází u tohoto typu k tvorbě vezikul. Autofagií zprostředkovanou chaperony jsou degradovány proteiny, které ve své struktuře obsahují aminokyselinový motiv Lys-Phe-Glu-Arg-Gln. Po rozpoznání tohoto motivu Hsc-70 proteinem chaperonu, dojde k vytvoření komplexu a jeho přenosu k povrchu lysozomu. Příslušná mutace v tomto motivu může zapříčinit to, že protein nemůže být touto cestou degradován. Zde je komplex navázán na cytozolový konec lysozomálního s membránou asociovaného proteinu 2a (LAMP2a), jehož prostřednictvím je komplex translokován do lysozomu. Zde je pak protein degradován a na uvolněný Hsc-70 protein pak může být navázán další protein. Na rozdíl od makro- a mikroautofagie jde pouze o selektivní způsob degradace (Cuervo A. M., 2009; Glick D., 2010; Überall I., 2010).



Obr. 5 - Typy autofagie v savčích buňkách – makroautofagie, mikroautofagie a autofagie zprostředkovaná chaperony (převzato z Mizushima N., 2011 a upraveno)

### 3.2.2 Průběh autofagie v savčích buňkách

Autofagie byla poprvé pozorována u kvasinek, u kterých je tudíž i dobře popsána. U savčích buněk však stále dochází k jejímu studiu. Až na malé rozdíly ale probíhá autofagie u všech eukaryot podobně (Obr. 6). U kvasinek dochází ve fázi iniciace autofagie ke vzniku pre-autofagozomové struktury (PAS). Tato struktura však není u savčích buněk pozorována a tudíž autofagie v savčích buňkách začíná vytvořením izolované membrány, tzv. fagoforu. Během elongace jsou částice určené k degradaci postupně obkloповány fagoforem. Jakmile dojde k úplnému uzavření částic, vznikne struktura označovaná jako autofagozom. V poslední fázi autofagie - maturaci, dochází ke splynutí autofagozomu s lysozomem za vzniku autofagolysozomu. V autofagolysozomu jsou pak částice pomocí enzymů degradovány.



Obr. 6 - Proces makroautofagie u kvasinek a savců. Pre-autofagozomovou strukturu (PAS) je možné pozorovat pouze u kvasinek. U savčích buněk autofagie začíná formováním fagoforu, neboli izolované membrány (převzato z Mizushima N., 2007 a upraveno)

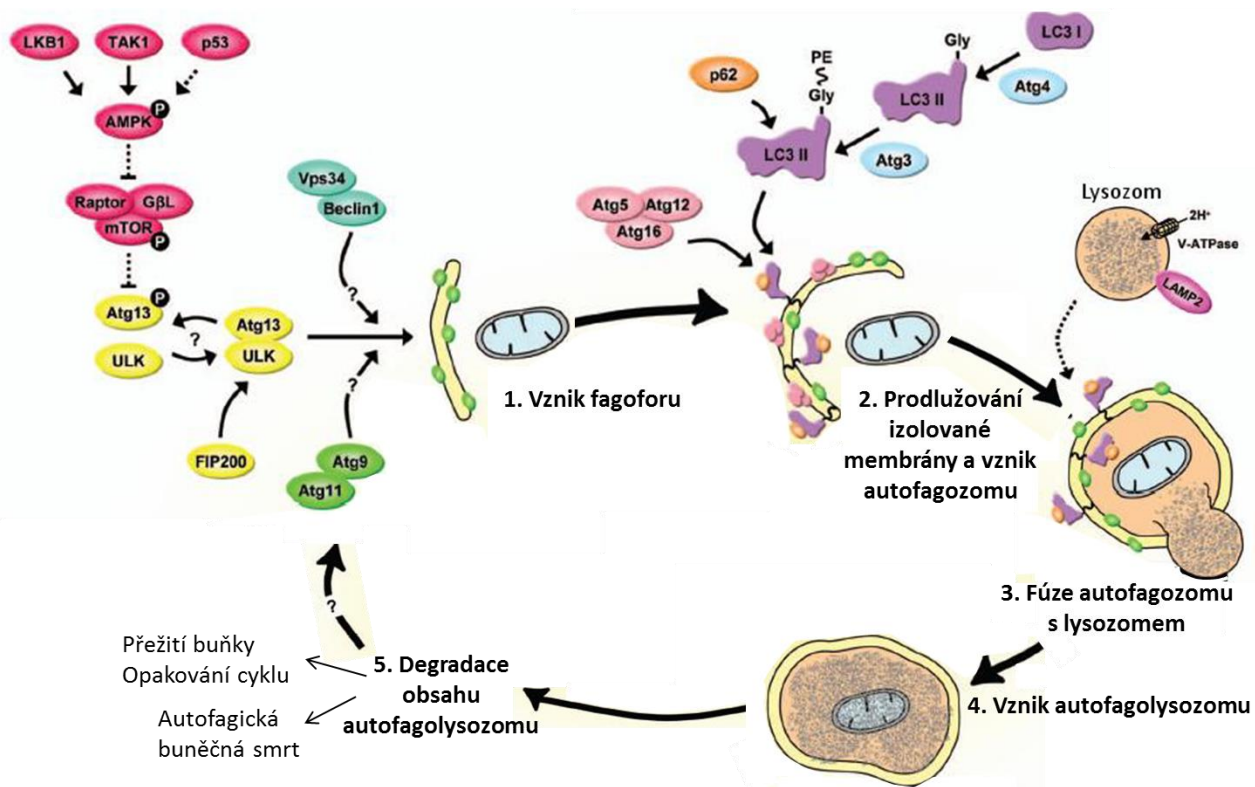
Jednotlivé kroky autofagie, tedy iniciace, elongace a maturace, jsou regulovány především pomocí genů specifických pro autofagii (Atg; Obr. 7). Více než 20 těchto genů bylo původně objeveno u kvasinek, ale většina z nich má své homology i v savčích buňkách (Berry D. L., 2007).

Zahájení autofagie v savčích buňkách je zajištěno vytvořením izolované membrány, tzv. fagoforu. Fagofor vzniká zejména z endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu nebo endozomů. Při nedostatku transmembránových proteinů nelze vyloučit tvorbu fagoforu *de novo* z lipidů v cytozolu (Glick D., 2010). Na formování fagoforu se podílí komplex proteinů ULK1-FIP200-Atg13. Proteinová unc-51-like kináza 1 (ULK1) představuje savčí homolog kvasinkového genu Atg1. Její správnou funkci zajišťuje multifunkční protein FIP200, který mimo jiné reguluje velikost buňky nebo se podílí na potlačení nádorů (Hara T., 2008; Ouyang L., 2012). Komplex ULK1-FIP200-Atg13 je inhibován mTOR kinázou třídy 1 (mTORK1). Pokud mTORK1 kináza fosforyluje protein Atg13, nedochází k jeho navázání na ULK1 protein. Tímto nevznikne fagofor a autofagie je zablokována (Díaz-Troya S., 2008). K aktivaci mTORK1 kinázy může dojít např. přes fosfatidylinositol-3-fosfát (PI(3)P) a Akt kinázu. Aktivita mTOR kinázy je naopak inhibována adenosinmonofosfátovou kinázou (AMPK). AMPK se v organismu podílí na regulaci metabolismu lipidů a glukózy v krvi, tím že upravuje poměr AMP/ATP.

Vysoký poměr mezi AMP a ATP spouští aktivaci serin/treoninové kinázy LKB1. Tímto dochází k fosforylaci AMPK a tím i k její aktivaci. AMPK může být také aktivována prostřednictvím TAK1 kinázy nebo genem p53. Další důležitou roli během tvoření fagoforu má protein Beclin-1. Ten je součástí komplexu s PI3K třídy III a vezikulárním proteinem třídění 34 (Vps34). Beclin-1 může být inhibován přes jeho BH3 doménu některými členy Bcl-2 rodiny (např.: Bcl-2, Bcl-XL a Bcl-w). Jeho inhibicí nedochází k tvorbě izolované membrány a ke spuštění autofagie. Po vytvoření fagoforu se na jeho stabilizaci neznámým způsobem podílí geny Atg9 a Atg11 (Puissant A., 2010).

Ve fázi elongace se uplatňuje komplex genů Atg16L-Atg5-Atg12. Tento komplex má zásadní význam pro protahování dvojité membrány fagoforu. Kromě něj se na vytvoření autofagozomu podílí LC3 protein. Jeho cytozolická forma, označována jako LC3-I, konjuguje s fosfatidylethanolaminem (PE). Díky působení genů Atg4, Atg7 a Atg3 se LC3-I mění na LC3-II formu. Zabudováním LC3-II do izolované membrány (fagoforu) dochází k jejímu prodlužování, až vznikne samostatný oddělený váček - autofagozom. Ve fázi maturace se pak autofagozom spojí s lysozomem za vzniku autofagolysozomu. V autofagolysozomu pak probíhá degradace částic pomocí enzymů. Zejména se zde uplatňují cysteinové proteázy - katepsiny. Získané živiny jsou poté buď znovu využity a buňka přežívá, nebo životaschopné faktory nejsou dostatečné a buňka zaniká autofagickou smrtí (Puissant A., 2010).

V rámci diplomové práce byl zkoumán vliv cisplatinu na úroveň exprese proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B, jež jsou zapojené do autofagické odpovědi v buňkách lidského ovarálního karcinomu A2780. Beclin-1 je savčí homolog kvasinkového genu Atg6, který představuje důležitou složku autofagie v savčích buňkách a hraje také roli v iniciaci mitofagie (Choubey V., 2014). Jak již bylo zmíněno výše, Beclin-1 je důležitý pro tvorbu autofagozomu, avšak pouze pokud tvoří komplex s kinázou PI3K. Jádrem tohoto komplexu dále tvoří Vps34, p150. Beclin-1 má množství vazebných partnerů, které mohou pozitivně nebo negativně regulovat autofagii. Například Atg14, UVRAG a SH3GLB1 zodpovídají za pozitivní regulaci na formaci a maturaci fagozomu, zatímco Rubicon, KIAA0226, Bcl-XL a Bcl-2 mají inhibiční účinky. Další důležité proteiny interagující s Beclinem-1 jsou AMBRA1 a Bcl-2L11, které přepínají lokalizaci Beclinu-1 mezi cytoskeletem a endoplazmatickým retikulem. V nedávné studii bylo také prokázáno, že s Beclinem-1 interaguje protein spojený s Parkinsonovou chorobou (Choubey V., 2014). Protein Beclin-1 zastává také funkci nádorového supresoru a má zásadní význam pro autofagické potlačení nádorů v raném stádiu. Mutace v genech pro Beclin-1 tak může přispět k tvorbě nádorů prostřednictvím deregulace autofagie (Yue Z., 2003). Snížení úrovně Beclinu-1 má vliv na vznik neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova, Huntingtonova a Machado-Josephova choroba (Choubey V., 2014). Druhým studovaným proteinem byl LC3-II A/B, který představuje savčí homolog kvasinkového genu Atg8. LC3-II forma proteinu se během autofagie uplatňuje při tvorbě autofagozomu, kdy jeho zabudováním dochází k prodlužování izolované membrány. LC3-II protein, jakož i jeho izoformy LC3-II A a LC3-II B, jsou používány jako markery autofagie (Klionsky D. J., 2012).



Obr. 7 - Proces makroautofagie u savců (převzato z Puissant A., 2010 a upraveno)

### 3.3 Autofagie a nádorová onemocnění

U nádorového onemocnění dochází k nekontrolovatelnému množení buněk a současnému potlačení buněčné smrti. Bylo prokázáno, že u nádorových buněk se vyskytují poruchy jak v apoptické, tak v autofagické dráze. Právě role autofagie však není v průběhu nádorového onemocnění zcela objasněna. V důsledku vzniku hypoxie a nedostatku živin během rychlého růstu nádorové tkáně dochází ke spuštění autofagie. Autofagie pak může fungovat buď jako adaptační mechanismus umožňující nádorové buňce přežít vzniklý metabolický stres, nebo může nádorové buňky usmrtit. Kromě toho také může autofagie způsobit rozklad mitochondrií, které spouštějí vnitřní dráhu apoptózy. Není tak zcela jasné, jestli autofagie nádorové bujení podporuje, nebo se jej snaží potlačit. Proto se objevila hypotéza, že autofagie zpočátku růst nádoru spíše potlačuje, zatímco v pozdějším období spíše podporuje jeho růst (Mizushima N., 2005; Überall I., 2010). Aktivita autofagie může být rozdílná u různých typů nádorů a je také závislá na stavu diferenciace. Snížená aktivita autofagie se vyskytuje např. u nádorů jater, slinivky břišní, prsu a u prekancerózního stádia. Naopak zvýšenou autofagickou aktivitu vykazují nádory tlustého střeva, plic (Überall I., 2010).

#### 3.3.1 Regulace autofagie v nádorových buňkách

V nádorových buňkách může být autofagie regulována několika cestami. Hlavním negativním regulátorem autofagie je především serin/treoninová kináza mTOR, která za normálních okolností kontroluje množství růstových faktorů, živin a pozitivně ovlivňuje buněčný růst. Avšak při patologických stavech, kdy dochází k její aktivaci prostřednictvím onkoproteinů nebo ztrátou nádorových supresorů, se podílí na vzniku a progresi

nádorového onemocnění (Díaz-Troya S., 2008). V savčích buňkách se kináza mTOR vyskytuje ve dvou formách – jako multiproteinový komplex mTORK1 a mTORK2. Avšak pouze aktivita mTORK1 může být farmakologicky inhibována rapamycinem, temsirolimem, everolimem aj. Analogy rapamycinu se používají v léčbě gliomů a pozdějších stádií karcinomů ledvin (Überall I., 2010; Klener P., 2013). Kináza mTOR1 může být také inhibována hladověním, kdy dochází k defosforylaci Atg13, čímž se zvyšuje jeho afinita k ULK1 nebo aktivací AMPK a komplexu TSC1/2 (Díaz-Troya S., 2008; He C., 2009).

Činností mTOR1 kinázy je inhibován komplex ULK1-FIP200-Atg13, který se uplatňuje v první fázi autofagie (Obr. 8 – A). Proteinová unc-51-like kináza 1 (ULK1) představuje savčí homolog kvasinkového genu Atg1. Její správnou funkci zajišťuje multifunkční protein FIP200, který mimo jiné reguluje velikost buňky nebo se podílí na potlačení nádorů (Hara T., 2008). Společně s Atg13 tvoří komplex ULK1-FIP200-Atg13, který je zodpovědný za vytvoření fagoforu. Tento komplex je inhibován mTOR kinázou třídy 1 (mTORK1), která v prostředí bohatém na živiny nadměrně fosforyluje Atg13. Protein Atg13 má pak nižší afinitu k ULK1 a nemůže se tak na něj navázat. Tímto nevznikne fagofor a autofagie je zablokována (Ouyang L., 2012).

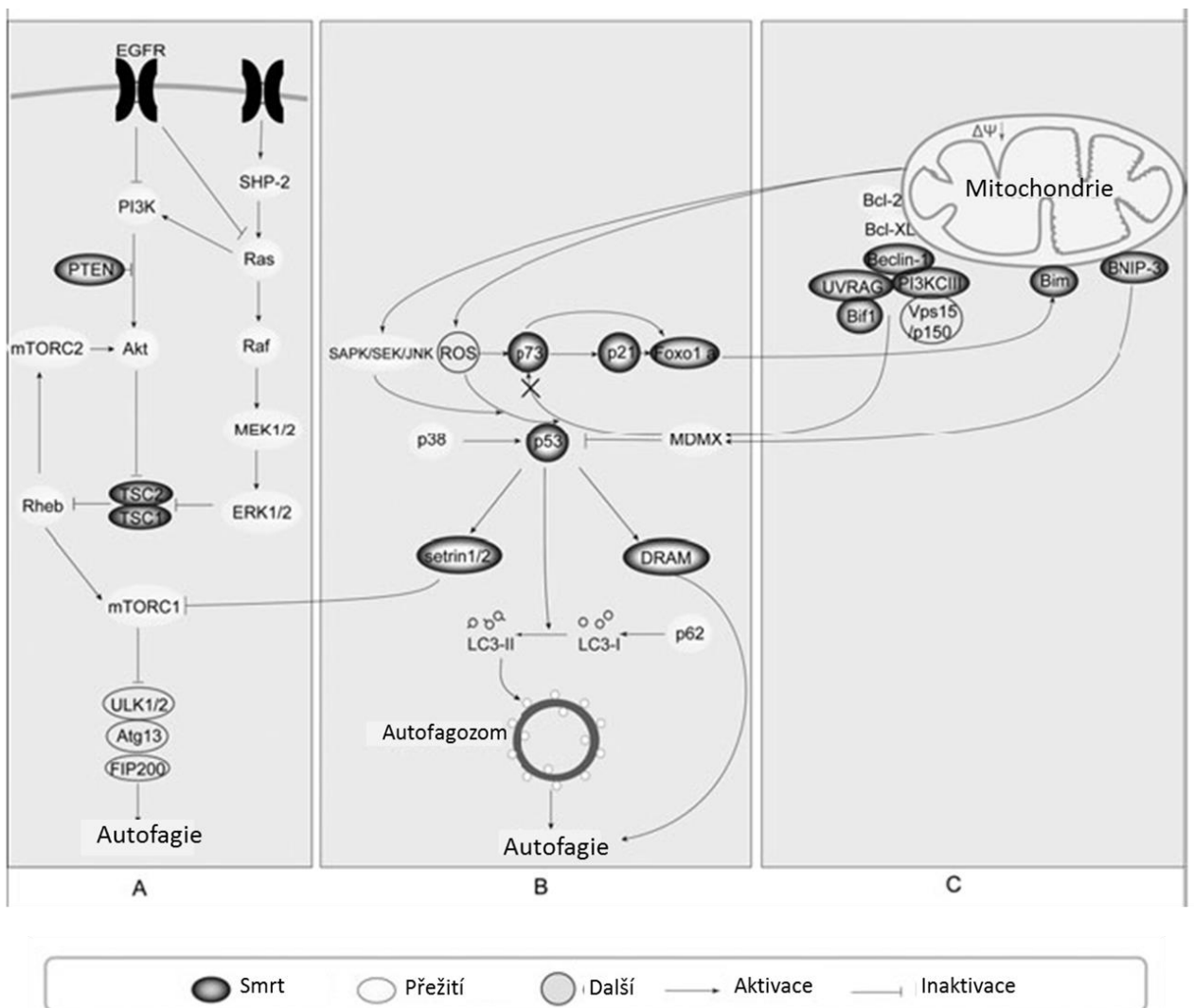
K aktivaci mTOR1 kinázy může dojít několika způsoby. U celé řady nádorů (např.: ukarcinomu plic, prostaty, vaječníků a slinivky) dochází k aktivaci mTORK1 pomocí PI3K a Akt (Obr. 8 – A). Tato dráha se uplatňuje hlavně při regulaci translace a proliferace buněk a představuje hlavní cíl při terapii širokého spektra nádorových onemocnění. Kaskáda PI3K-Akt-mTORK1 je úzce propojena s dalšími signálními drahami (např. MAPK a NF- $\kappa$ B) a důležitými regulačními proteiny (např.: Ras a Raf). Lipidová kináza PI3K může být aktivována jak přes buněčné receptory, tak proteiny (např.: Ras; Klener J., 2013). PI3K dále fosforyluje fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfát (PI(4,5)P<sub>2</sub>) na fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfát (PIP<sub>3</sub>) a aktivuje serin/treoninovou proteinovou kinázu Akt. Za normálních okolností je vznik PIP<sub>3</sub> blokován tumor supresorovým genem PTEN, jehož funkce však může být vlivem mutace deaktivována. Mutace také aktivuje komplex tuberózní sklerózy 1 a 2 (TSC1/2), který prostřednictvím Rheb aktivuje mTORK1 (Puissant A., 2010; Ouyang L., 2012). Kromě aktivace mTORK1 se tato dráha podílí na inhibici apoptózy v důsledku zvýšení exprese antiapoptických genů (např. Bcl-XL, XIAP - Survivin; Klener J., 2013).

Další signální dráhou aktivující mTORK1 je Ras-Raf-MAPK (Obr. 8 – A), jejíž spuštění je vyvoláno snížením množství aminokyselin (He C., 2009). Navázání signálu na receptor způsobí hydrolýzu GTP na GDP a aktivaci Ras. Ras je protein, který hraje důležitou roli v přenosu mitogenních signálů z extracelulárního do intracelulárního prostoru. Aktivaci Ras se dále spouští signální kaskáda mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK), ke které patří kaskáda Raf-MEK1/2-ERK1/2. Kaskáda Raf zahrnuje tři serin/treoninové kinázy – ARAF, BRAF a CRAF/RAF1. Mutace v BRAF se objevuje u 60 – 70% maligních nádorů a inhibice Raf signální kaskády se tudíž stala hlavním terapeutickým cílem. Aktivovaný Raf dále fosforyluje mitogenem aktivované proteinové kinázy 1/2 (MEK1/2), které aktivují kinázy ERK1/2 (Klener P., 2013).

Protein p53 hraje kromě apoptózy také důležitou úlohu v autofagii (Obr. 8 – B). Indukce autofagie prostřednictvím p53 může být přímá nebo nepřímá. Během nepřímé indukce autofagie protein p53 aktivuje negativní regulátory mTOR kinázy (např. PTEN, AMPK, Sestrin 1/2 atd.), které inhibují činnost mTOR kinázy a tímto spouštějí autofagii. V jádře protein p53 podněcuje autofagii také interakcí s DRAM. DRAM je lyzozomální protein, který vyvolává akumulaci autofagozomů (Crighton D., 2007). K indukci autofagie

může také dojít přímým mechanismem, kdy snížená exprese nebo farmakologická inhibice p53 spouští autofagii. Rozdílný vliv na autofagii má také lokalizace p53. Zatímco cytoplazmatický p53 autofagii inhibuje, jaderný p53 působí jako pozitivní regulátor autofagie (Puissant A., 2010).

Autofagie může být také regulována proteinem Beclin-1 (Obr 8 – C). Beclin-1 se podílí na tvorbě autofagozomu prostřednictvím komplexu s PI3 kinázou, Vsp34, p150 a Atg14. S Beclinem-1 interaguje gen UVRAG a Bif-1, které výrazně zlepšují aktivitu PI3 kinázy, čímž je usnadněna autofagická odpověď. Činnost Beclinu-1 je naopak inhibována prostřednictvím Rubicon, který negativně reguluje maturaci fagoforu (Yang Ch.- S., 2012). Beclin-1 může být inhibován také přes jeho BH3 doménu některými členy Bcl-2 rodiny (např.: Bcl-2L, Bcl-XL a Bcl-w). Jeho inhibicí nedochází k tvorbě izolované membrány a ke spuštění autofagie (Mizushima N., 2007; Ouyang L., 2012). Defekty v genech pro Beclin-1 jsou spojeny se vznikem nádorů prsu, vaječníků a prostaty (Lozy F., 2014).



Obr. 8 – Signální dráhy autofagie v rakovinných buňkách (převzato z Ouyang L., 2012 a upraveno)

### 3.3.2 Autofagie a apoptóza

Autofagie představuje programovanou buněčnou smrt II. typu (PCD II). Od apoptózy, která je označovaná jako programovaná buněčná smrt I. typu (PCD I), se liší v několika morfologických a biochemických znacích (viz kapitola 3.1 Programovaná buněčná smrt). Hlavní rozdíl je však takový, že apoptóza vždy způsobí smrt buňky na rozdíl od autofagie, která do jisté doby umožňuje buňce přežít i za nepříznivých podmínek. I když jsou autofagie a apoptóza odlišné děje, byly mezi nimi prokázány vzájemné vztahy. Za určitých okolností může autofagie a apoptóza působit synergicky, za jiných okolností může být autofagie spuštěna tehdy, pokud je apoptóza potlačena nebo naopak. Také může dojít k „přepínání“ mezi oběma typy buněčné smrti. Není tedy překvapující, že obě dráhy spolu sdílejí některé regulační molekuly (např.: Bcl-2 proteiny, Beclin-1, p53, Atg5 atd.; Levine B., 2005; Überall I., 2010; Ouyang L., 2012).

Gen Atg5 je během autofagie potřebný k formaci a prodlužování fagoforu. Kromě toho také u buněk indukuje apoptózu. Apoptóza je vyvolána štěpením Atg5 genu pomocí kalpainu. Kalpain je cysteinová proteáza, která je aktivována vápenatými ionty. Zkrácená forma Atg5 je translokována z cytozolu do mitochondrií, kde se spojí s anti-apoptickým proteinem Bcl-XL, čímž inaktivuje jeho anti-apoptickou aktivitu. Tímto dochází ke kolapsu mitochondriálního membránového potenciálu, uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspáz (Shi M., 2013).

Dalším prostředníkem mezi autofagií a apoptózou jsou anti-apoptické proteiny rodiny Bcl-2, konkrétně Bcl-XL a Bcl-2L. Tyto proteiny jsou označovány jako hlavní regulátory vnitřní dráhy apoptózy. Jejich navázání na pro-apoptické proteiny Bax a Bak brání uvolnění cytochromu c z mitochondrií a spuštění apoptózy (Zou H., 1997; Gross A., 1998; Ouyang L., 2012; Galluzzi L., 2012). Kromě jejich antiapoptické funkce, mohou také negativně ovlivňovat autofagii. Jejich navázání na Beclin-1 brání vytvoření fagoforu, který je nezbytný během iniciace autofagie. K indukci autofagie pak může dojít uvolněním vazby mezi Beclinem-1 a BH3 proteiny pomocí fosforylace DAPK nebo JNK kinázy (Mizushima N., 2007; Gump J. M., 2011; Ouyang L., 2012).

Také samotný Beclin-1 propojuje autofagii s apoptózou. Kromě toho, že jeho aktivitu negativně ovlivňují anti-apoptické proteiny rodiny Bcl-2, může být jeho aktivita ovlivňována prostřednictvím kaspázy 3. Kaspáza 3 štěpí Beclin-1 během terminální fáze apoptózy. Zkrácená forma Beclinu-1 není schopna spustit autofagii. Regulace Beclinu-1 prostřednictvím apoptotických členů může buď spouštět nebo inhibovat autofagii (Gump J. M., 2011).

Protein p53 je spíše spojován s apoptózou, avšak své uplatnění má také během autofagie. Vlivem poškození DNA dochází k jeho aktivaci. Protein p53 zvyšuje expresi proapoptotických genů (Bax, PUMA, NOXA atd.) a inhibuje geny antiapoptotické (Bcl-2, Mcl-1). Výsledkem je zástava buněčného cyklu v některém z kontrolních bodů a spuštění opravy DNA. Pokud však DNA nelze opravit, podílí se p53 na indukci apoptózy. V organismu tak plní funkci tumor supresorového genu (Klener P., 2013). Prostřednictvím nukleárního p53 může také být spuštěna autofagie a to buď aktivací negativních regulátorů mTOR kinázy (např. PTEN, AMPK, Sestrin 1/2 atd.), které inhibují činnost mTOR kinázy, nebo interakcí s proteinem DRAM, který vyvolává akumulaci autofagozomů (Crichton D., 2007; Puissant A., 2010).



### 3.3.3 Role autofagie v rezistenci k protinádorové terapii

Indukce buněčné smrti a potlačení buněčného přežití jsou hlavní principy léčby rakoviny. Nejčastějšími léčebnými metodami jsou chirurgické odstranění nádorového ložiska, radioterapie a chemoterapie. Právě rezistence vůči chemoterapeutickým léčivům představuje hlavní překážku pro úspěšnou onkologickou léčbu, které se v dnešní době věnuje velká pozornost.

K rezistenci nádorových buněk na léčiva přispívají různé faktory, včetně genetických a epigenetických změn. Objevily se studie, které ukazují, že svou roli v rezistenci k protinádorové terapii hraje také autofagie. Na jedné straně je autofagie aktivována jako ochranný mechanismus, který pomáhá nádorovým buňkám přizpůsobit se stresu vyvolanému chemoterapeutickými léčivy, což má za následek vznik rezistence některých nádorových buněk na chemoterapii. Tomu lze zabránit inhibicí autofagie, kdy by se dříve rezistentní rakovinné buňky staly znovu citlivými k účinkům chemoterapeutických léčiv. Na druhé straně autofagie může také zprostředkovat smrt nádorové buňky, čímž se zvyšuje účinnost léčby. Role autofagie je u vzniku rezistence rozporuplná, neboť autofagie může zvýšit nebo naopak snížit účinnost protinádorové léčby v závislosti na použitém léčivu a druhu nádorového onemocnění. Například NVP-BEZ235, inhibitor PI3K-Akt-mTOR dráhy, umožňuje přežití a vznik rezistence u ledvinových nádorových buněk, zatímco u nádorů močového ústrojí způsobí usmrcení nádorových buněk.

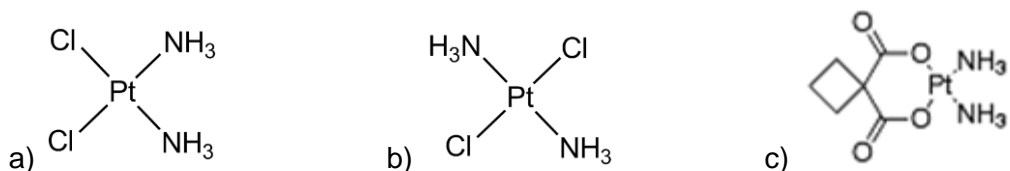
Kombinace běžné léčby s cílenou inhibicí autofagie tak představuje potenciální cíl v terapii nádorových onemocnění, který by mohl vést k větší účinnosti léčby a ke zlepšení klinických výsledků onkologických pacientů. V současné době se jako vhodné farmakologické inhibitory autofagie jeví např.: 3-metyladenin (inhibitor PI3 kinázy), bafilomycin A (specifický inhibitor vakuol typu H<sup>+</sup>-ATPáza), chloroquin nebo hydroxychloroquin (látky narušující fúzi autofagozomu s lysozomem). Dále bylo také provedeno cílené vyřazení některých genů souvisejících s autofagií, např.: Atg5, Atg6 a Atg7. V současné době se studium autofagie zabývá objasněním genetických a fyziologických podmínek určujících, zda autofagie umožní přežití buněk nebo jejich smrt (Sui X., 2013; Choi K. S., 2012).

### 3.4 Cisplatina a její analoga

V roce 1978 byla k léčbě rakoviny do klinické praxe zavedena cisplatina a tři roky poté její přímý analog karboplatina. Cisplatina je generický název pro *cis*-diammindichloroplatinatý komplex (cDDP), který je také jinak nazýván podle svého objevitele jako Peyronův chlorid.

Ve své struktuře cisplatina obsahuje 11 atomů – k centrálnímu atomu platiny v oxidačním stupni II jsou navázány dvě skupiny amoniaku a dva atomy chlóru, které představují reaktivní místo tohoto komplexu. Z hlediska protinádorové účinnosti cisplatin je důležitá poloha těchto reaktivních skupin. Pouze konfigurace *cis* (tedy poloha chlórů vedle sebe) je účinná. Její izomer transplatina, která má reaktivní skupiny chlóru umístěny v konfiguraci *trans* (tedy proti sobě), je protinádorově neúčinný i přesto, že je její chemické složení shodné s cisplatinou. Karboplatina je analog cisplatin, který má stejný mechanismus účinku jako cisplatina. Účinkuje také na podobné druhy nádorů jako cisplatina, oproti ní má však pozměněné některé toxické účinky (Brabec V., 1998). Chemická struktura cisplatin, jejího izomeru transplatin a také jejího analogu karboplatin jsou uvedeny na obrázku 9.





Obr. 9 – Chemická struktura cisplatiny (a), transplatiny (b) a karboplatiny (c)

### 3.4.1 Mechanismus biologického účinku cisplatiny

Cisplatina se využívá především k léčbě nádorového onemocnění varlat, prostaty, vaječníků, močového měchýře, trávicí trubice, malobuněčných nádorů plic a některých typů nádorů hlavy a krku. Není však účinná v léčbě nejčastěji se vyskytujících nádorů u lidí jako jsou nádory tlustého střeva a prsu. K faktorům, které omezují léčbu pomocí tohoto cytostatika, patří především její vysoká toxicita a potenciální kancerogenní a mutagenní vlastnosti. Cisplatina má pravděpodobně také teratogenní účinky (Brabec V., 1998; Informační leták k léčivu CISPLATIN "EBEWE").

Molekula cisplatiny proniká do nádorové buňky, kde dochází k výměně chloridových ligandů za molekuly vody. Tímto se z původně elektroneutrálního komplexu cisplatiny stane kationt, který ochotně reaguje se záporně nabitou DNA. Cisplatina reaguje s DNA ve dvou krocích. V prvním kroku se váže na nukleovou bázi guanin. Ve druhém kroku vytváří můstek mezi dvěma sousedními molekulami guaninu v jednom řetězci DNA, čímž narušuje její pravidelné uspořádání a způsobí ohnutí podélné osy dvoušroubovice směrem do velkého žlábků DNA. Po vytvoření můstku se v místě jeho vzniku na DNA specificky naváží bílkoviny obsahující tzv. HMG box a bílkovina histon H1. Tyto bílkoviny brání přístupu složek reparačního systému k poškozené DNA. Při replikaci nebo transkripci DNA pak tyto neopravené můstky představují překážku pro polymerázy a brání průběhu těchto dějů, které jsou pro dělení buňky nezbytné. Tímto mechanismem cisplatina zabraňuje dělení nádorové buňky (Brabec V., 1998; Sun X., 2014). Kromě toho cisplatina působí také nespecificky na buněčný cyklus a ovlivňuje tedy i buňky v G<sub>0</sub> fázi. Podílí se na inhibici určitých imunitních procesů, avšak stimuluje cytotoxicitu makrofágů (Informační leták k léčivu CISPLATIN "EBEWE"). Izomer cisplatiny – transplatin je protinádorově neúčinná, jelikož nemůže kvůli jinému prostorovému uspořádání vytvořit můstek mezi dvěma nukleotidy. Proto se předpokládá, že právě vytvoření můstků představuje poškození, které je odpovědné za protinádorovou účinnost cisplatiny (Brabec V., 1998).

### 3.4.2 Rezistence buněk k cisplatině

Další překážkou, která omezuje používání cisplatiny v onkologické léčbě je často se vyskytující získaná rezistence nádorů k tomuto léčivu. Rezistence k cisplatině, která se objevuje po opakované léčbě tímto cytostatikem, výrazně snižuje její léčebný účinek.

Na získání rezistence buněk k cisplatině se uplatňuje mnoho mechanismů, které vykazují multifaktoriální charakter. Mezi tyto mechanismy patří např.: nedostatečné navázání cDDP na DNA (cDDP je během cesty k biologickému cíli částečně inaktivována), zvýšená reparace DNA, deregulovaná exprese transportérů a změněná exprese a aktivace genů zapojených v buněčné smrti (Wang J., 2014). U 70-90% případů se vyskytuje také snížená akumulace léčiva v buňce, která má vliv na vznik rezistence.

Platí však, že snížená akumulace léčiva není přímo úměrná úrovni rezistence. Snížená akumulace léčiva v buňce může být způsobena buď inhibicí vstřebávání léčiva, zvýšením efluxu léčiva nebo oběma způsoby. U nádorových buněk byla objevena rodina tzv. MRP proteinů, která je složena ze sedmi členů. Tyto proteiny jsou spojeny s efluxem celé řady léků z nádorových buněk. Konkrétně za zpětné čerpání cisplatin ven z buňky je zodpovědný MRP2 protein. Dále jsou s tímto dějem spojeny dvě ATPázové pumpy ATP7A a ATP7B (Siddik Z. H., 2003). Žádné studie však nepřinesly přesné objasnění mechanismu, který je zodpovědný za rezistenci nádorových buněk k cisplatině.

Dalším dějem, který má za následek vznik rezistence nádorových buněk k cisplatině, je autofagie. Bylo objeveno, že nádorové buňky plic rezistentní k cisplatině H460/cis vykazovaly významně nižší úroveň autofagie v porovnání s jejich protějšky citlivými k cisplatině. Společná léčba cisplatinou a induktorem autofagie triflorperazinem pak vedla ke zvýšení citlivosti H460/cis rezistentních buněk k cisplatině. Proto bylo navrženo, že snížení úrovně autofagie může podporovat rezistenci k cisplatině u nádorového onemocnění plic. V dalších studiích, kde byly použity jiné druhy nádorových buněk, byl ale prokázán opačný efekt autofagie. Například u lidských nádorových buněk jícnu OE19 a KYSE450 inhibice autofagie prostřednictvím umlčení exprese Beclinu-1 a Atg7 zlepšovala efekt chemoterapeutika 5-floruracilu. Tato studie tak ukazuje, že inhibice autofagie nevyvolává u těchto buněk rezistenci, naopak může sloužit jako potenciální cíl k zlepšení terapeutické účinnosti obvyklých chemoterapeutik. Jinak je tomu u nádorových buněk prsu MCF-7, kde naopak indukce autofagie zlepšuje cytotoxický účinek doxorubicinu a etoposidu (Bao L., 2015).

V rámci diplomové práce byla zkoumána rezistence nádorových buněk vaječníků k cisplatině. U ovariálních nádorových buněk bylo zjištěno, že léčba cisplatinou aktivuje ERK a gen Atg5, čímž indukuje autofagii. Studie dále prokázaly, že nadměrná exprese genu Atg5 zvyšuje citlivost buněk na různé druhy léků. Indukce autofagie u ovariálních nádorových buněk umožňuje jejich přežívání, působí proti toxickým účinkům cisplatin a má tak za následek vznik rezistence k tomuto léčivu. Farmakologická inhibice autofagie, nebo umlčení ERK a genu Atg5 prostřednictvím siRNA pak může učinit buňky se získanou rezistencí k cisplatině znovu citlivé k účinkům tohoto cytostatika (Wang J., 2014). Další studie prokázaly, že důležitou roli v překonání rezistence hraje Beclin-1. Inhibice autofagie prostřednictvím umlčení exprese Beclinu-1 totiž učiní rezistentní buňky opět citlivé k léčbě cisplatinou (Bao L., 2015). Jako slibná strategie pro překonání rezistence lidských ovariálních buněk k cisplatině se jeví také snížení účinků hypoxií indukovatelného faktoru 1 (HIF1), který reguluje metabolické enzymy podílející se na glykolýze. U normálních buněk, které jsou citlivé na účinky cisplatin, způsobuje cisplatin degradaci  $\alpha$  podjednotky HIF1 (HIF1 $\alpha$ ), zatímco u jejich rezistentních protějšků se tak neděje. Proto by mohlo genetické umlčení nebo farmakologická degradace HIF1 $\alpha$  zvýšit odezvu k cisplatině. Umlčení HIF1 $\alpha$  u rezistentních nádorových buněk také umožňuje přeorientování aerobní glykolýzy na mitochondriální oxidativní fosforylaci. To vede k vyvolání apoptotické buněčné smrti prostřednictvím nadprodukce reaktivních forem kyslíku, které vznikají jako vedlejší produkt oxidativní fosforylace (Ai Z., 2016).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál a metody

#### 4.1.1 Biologický materiál a chemikálie

- buňky lidského ovariálního karcinomu A2780 a A2780cisR poskytl prof. B Keppler z Univerzity of Vienna v Rakousku
- RPMI 1640 (Sigma, Česká republika)
- 10% fetální hovězí sérum (FBS; Sigma, Česká republika)
- streptomycin ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; Sigma, Česká republika)
- penicilin ( $100 \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; Sigma, Česká republika)
- trypsin/EDTA (Sigma, Česká republika)
- cisplatina (Sigma, Česká republika)
- 100% dimethylsulfoxid (DMSO; Duchefa, Nizozemsko)
- Thiazolová modř (MTT; Duchefa, Nizozemsko)
- fosfatázový inhibitorový koktejl (Sigma, Česká republika)
- proteázový inhibitorový koktejl (Sigma, Česká republika)
- tris-(hydroximethyl)-aminomethan (TRIS; Serva, Německo)
- 0,1% hovězí sérový albumin (BSA; Takara, Japonsko)
- 100% ethanol (Penta, Česká republika)
- marker 12 000 – 225 000 Da (GE Healthcare, Velká Británie)
- kontrolní buněčné extrakty pozitivní a negativní na přítomnost LC3-II A/B proteinu (Cell Signaling, USA)
- PVDF membrána (Bio-Rad Laboratories, USA)
- 100% methanol (Penta, Česká republika)
- 10% persíran amonný (APS; Sigma, Česká republika)
- Tween® 20 (Sigma, Česká republika)
- N,N,N',N'- tetrametylendiamin (TEMED; Serva, Německo)
- primární protilátky: beta-actin (Abcam, Velká Británie), Beclin-1 a LC3-II A/B (Cell Signaling, USA)
- sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou: anti-myší IgG a anti-králíčí IgG (Cell Signaling, USA)
- 30% AA/BisAA 19:1 a 29:1 (Bio-Rad Laboratories, USA)
- činidlo Bradfordové (Bio-Rad Laboratories, USA)
- chemiluminiscenční substrát SuperSignal® West Dura (Thermo Fisher Scientific, USA)
- deionizovaná voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ )

#### 4.1.2 Použité roztoky a gely

Fosfátový pufr 10x pH 7,4 (PBS 10x)

- 150 mM NaCl
- 2 mM KCl
- 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Nonidet-P40 pufr (NP-40)

- 150 mM NaCl
- 1 mM NP-40
- 50mM Tris pH 8,0

Laemmliho nanášecí pufr 2x pH 6,8 (LSB 2x)

- 4 mM SDS
- 1 mM 2-merkptoethanol
- 2 ml glycerolu
- 0,4 mM bromfenolová modř
- 125 mM Tris HCl

Migrační pufr pH 8,3

- 25 mM Tris
- 190 mM glycinu
- 1 mM SDS

Transferový pufr

- 48 mM Tris
- 39 mM glycin
- 0,4 mM SDS
- 200 mM methanol

Tris pufr 10x pH 7,6 (TBS 10x)

- 50 mM Tris
- 150 mM NaCl
- doplnit do 1l deionizovanou vodou, adjustovat pH na 7,6 pomocí HCl

Tris pufr s Tween (TBST)

- 50 ml TBS 10x
- 450 ml vody
- 0,5 ml Tween 20

#### Barvivo Ponceau S 0,1%

- 0,1 g Ponceau S
- 10 ml ledové kyseliny octové
- doplnit do 1 l deionizovanou vodou

#### 5% blokovací mléko

- 50 g sušeného mléka bez tuku
- 100 ml TBS 10x
- 1 ml Tween 20
- 900 ml vody

#### Mléko pro ředění protilátek

- 12,5 g sušeného mléka bez tuku
- 25 ml TBS 10x
- 225 ml vody

#### 12% dělicí gel

- 4,9 ml vody
- 6 ml 30% akrylamidu
- 3,8 ml tris-Cl (1,5 M, pH 8,8)
- 0,15 ml 10% SDS
- 0,15 ml 10% amonium persulfátu
- 0,006 ml TEMED

#### 15% dělicí gel

- 3,4 ml vody
- 7,5 ml 30% akrylamidu
- 3,8 ml tris-Cl (1,5 M, pH 8,8)
- 0,15 ml 10% SDS
- 0,15 ml 10% amonium persulfátu
- 0,006 ml TEMED

#### 5% zaostřovací gel

- 3,4 ml vody
- 0,83 ml 30% akrylamidu
- 0,63 ml Tris-Cl (1,0 M, pH 6,8)
- 0,05 ml 10% SDS
- 0,05 ml 10% amonium persulfátu
- 0,005 ml TEMED

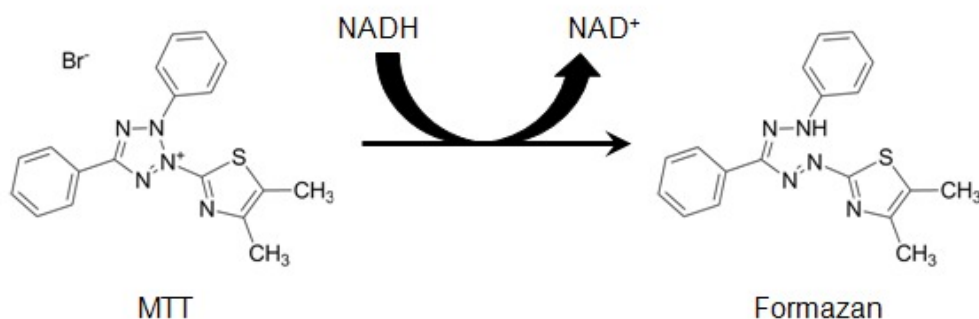
### 4.1.3 Metody

#### Kultivace buněk

Pro experimenty byly vybrány buňky lidského ovariálního karcinomu A2780 citlivé k působení cisplatinu a buňky A2780cisR se získanou rezistencí k tomuto léčivu. Uvedené buněčné linie se běžně používají k testování biologického účinku látek na bázi platiny. Buňky byly pěstovány dle standardního protokolu v médiu RPMI 1640, které bylo doplněno o tepelně inaktivované fetální hovězí sérum (10%), streptomycin ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) a penicilin ( $100 \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Získaná rezistence A2780cisR buněk byla udržována přidávkou cisplatinu ( $1 \mu\text{M}$ ) do růstového média při každé druhé pasáži. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , v atmosféře 5% oxidu uhličitého a po dosažení konfluency pasážovány za pomoci trypsinu.

#### MTT test buněčné viability

Citlivost nádorových buněk k cisplatině byla testována pomocí kolorimetrického MTT testu. Nejdříve byla k buňkám A2780 a A2780cisR přidána cisplatinu o koncentraci 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,3; 12,5; 25 a  $50 \mu\text{M}$ . Takto ošetřené buňky byly inkubovány 72 hod při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po této době byl proveden MTT test buněčné viability, kdy buňky byly 4 hod inkubovány s  $10 \mu\text{l}$  0,5% MTT při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tato metoda je založena na redukci žlutého 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylní tetrazolium bromidu (MTT) mitochondriálními enzymy živých, metabolicky aktivních buněk. Redukcí vznikají tmavě fialové krystaly formazanu (Obr. 10), které lze rozpustit přidáním silného detergentu. V našem případě byl použit 100% DMSO. Po přidání  $100 \mu\text{l}$  100% DMSO byly buňky ponechány 20 min na třepačce. Intenzita fialového zbarvení vzniklého roztoku se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce  $570 \text{ nm}$  a je přímo úměrná počtu živých buněk. Čím je tmavší barva roztoku a tedy i vyšší absorbance, tím je vyšší procento živých buněk. Z grafické závislosti přežívání buněk (%) na koncentraci testované látky ( $\mu\text{M}$ ) lze pak vypočítat hodnoty  $\text{IC}_{50}$ .  $\text{IC}_{50}$  udává koncentrace sloučeniny, při níž testovaná chemikálie způsobí smrt 50 % buněk (I. Miki, 1993; T. L. Riss, 2013).



Obr. 10 – Redukce MTT na formazan (převzato z: Riss T. L., 2013)

## **Příprava proteinových extraktů**

Buňky A2780 a A2780cisR byly sazeny na kultivační misky (60 mm; TPP) v hustotě  $10^3$  buněk na 6 ml růstového média a inkubovány při 37 °C v 5% atmosféře oxidu uhličitého přes noc. Poté byly ovlivněny cisplatinou v řadě koncentrací 1,5; 3; 6; 12 a 24  $\mu\text{M}$  a dále ponechány v inkubátoru po dobu 24 hod. Následně byly buňky sklizeny do 200  $\mu\text{l}$  pufru NP-40 s přidavkem fosfatázových a proteázových inhibitorů a třepány 1 hod na ledu. Během této doby došlo k narušení povrchu buněk. Proteiny byly následně odděleny od ostatních částí buněk centrifugací při 12 000 rpm po dobu 30 min při 4 °C. Nakonec byl odpipetován supernatant, který se používal v dalších částech experimentu.

## **Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích**

Celková koncentrace proteinů v buněčném lyzátu byla stanovena metodou Bradfordové. Měření probíhalo na mikrotitrační destičce s 96 jamkami, jež umožňuje použití minimálního množství vzorku, současné měření koncentračních řad nebo měření v několika opakováních. Nejdříve byla v dubletu připravena koncentrační řada. Jako standard pro sestavení kalibrační křivky byl použit hovězí sérový albumin (BSA) v řadě koncentrací 0, 1, 2, 3, 4, 5 a 10  $\mu\text{M}$ . Následně byly v tripletu napipetovány vzorky jednotlivých extraktů. Ke všem vzorkům extraktů a koncentrační řady bylo poté přidáno 200  $\mu\text{l}$  činidla Bradfordové. Základní složkou činidla Bradfordové je barvivo Coomassie brilliant blue G-250. Barvivo se váže v kyselém prostředí na molekuly proteinu dvěma způsoby. Na nepolární část proteinu se váže trifenylmethanová skupina a na bazické skupiny vedlejších řetězců aminokyselin argininu a lysinu je vázán anion sulfoskupiny. Po navázání barviva Coomassie brilliant blue G-250 na proteiny dochází k změně barvy, které je úměrné množství proteinu (Káš J., 2005). Intenzitu zbarvení lze určit spektrofotometricky při 595 nm. Koncentrace proteinů v analyzovaném vzorku je poté zjištěna výpočtem z rovnice kalibrační křivky pro BSA standard.

## **SDS-PAGE**

Pro separaci proteinů ve vzorku byla použita diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Dodecylsulfát sodný (SDS) je denaturační činidlo, které tvoří komplexy s proteiny a uděluje jim celkový negativní náboj. Komplexy SDS-protein pak za přítomnosti elektrického pole migrují ke kladné elektrodě, tedy k anodě. Proteiny jsou takto rozděleny na základě své molekulové hmotnosti (Kinter M., 2000).

U diskontinuální elektroforézy jsou použity dva druhy gelů – zaostřující a dělicí, které se liší koncentrací polyakrylamidu a také složením pufru. V našem případě byl použit 5% zaostřující gel a 12% nebo 15% dělicí gel, poměr akrylamidu (AA) ku bisakrylamidu (Bis) 19:1 nebo 29:1. Hustota gelu a velikost pórů je ovlivněna koncentrací akrylamidu a -N,N'-methylenbisakrylamidu. Akrylamid ovlivňuje délku jednotlivých polyakrylamidových řetězců, zatímco -N,N'-methylenbisakrylamid určuje stupeň zesíťování gelu a tím i velikost pórů. Různý poměr AA:Bis ovlivňuje také použití daných gelů, např. pomocí 10% gelů jsou ideálně separovány středně velké proteiny (molekulová hmotnost 50-100 kDa), kdežto 15% gely jsou vhodné k separaci malých proteinů (molekulová hmotnost  $\leq 20$  kDa) (M. Kinter, 2000). Na gel bylo nanášeno 20  $\mu\text{g}$  proteinů, které byly doplněny do celkového objemu 15  $\mu\text{l}$  přidáním příslušného množství LSB 2x barvy a deionizované vody. Před samotným nanášením byly vzorky denaturovány v termobloku při 97 °C po dobu 5 min. Na gel bylo také nanášeno 5  $\mu\text{l}$  kolorimetrického

markeru proteinové velikosti (Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers), který umožňuje snadné a přesné určení polohy proteinů na polyakrylamidovém gelu. V neposlední řadě bylo na gel aplikováno 10  $\mu$ l LC3 II<sup>-</sup> a LC3 II<sup>+</sup> kontroly. LC3 II je protein, který vzniká během formování autofagozomu a slouží tedy jako indikátor autofagické aktivity (L. Bao, 2014). Jako LC3 II<sup>+</sup> kontroly jsou označeny extrakty z HeLa buněk, které byly ovlivněny chloroquinem, jež vyvolává autofagii. Na gelu by proto měl být patrný proužek odpovídající LC3 II proteinu. LC3 II<sup>-</sup> jsou naopak extrakty z neošetřených HeLa buněk a na gelu bychom tedy neměli žádný proužek detekovat. Samotná elektroforetická separace probíhala 20 min při 60 V v zaostřovacím gelu a poté 1,5 hod při 125 V v dělicím gelu.

### **Přenos proteinů na membránu**

Separované proteiny byly dále přeneseny z gelu na polyvinyl difluoridovou (PVDF) membránu pomocí metody „semi-dry“ Western blot. Při této metodě je na plochu bloteru na sebe umístěn papír, membrána, gel a druhý papír. Působením elektrického proudu jsou pak proteiny z gelu přeneseny na membránu. Blotování probíhalo 40 min při 20 V. Poté byla membrána 5 min barvena v Ponceau S. Ponceau S se běžně používá k nespecifickému reverzibilnímu obarvení proteinů, kterým propůjčuje červené zbarvení. Proteiny mohou být také vizualizovány např. barvivem Coomassie brilliant blue, amidočerní nebo stříbřením (Káš J., 2006). Citlivost barvení v Ponceau S je přibližně 2x větší než za použití Coomassie brilliant blue. Vizualizace proteinů pomocí Ponceau slouží jednak k ověření správného transferu proteinů z gelu na membránu, tak také poskytuje informaci o celkovém množství proteinů ve vzorku. Následně bylo nenavázané barvivo z membrány vymýváno deionizovanou vodou, čímž došlo k odstranění pozadí a zvýraznění jednotlivých pruhů obsahujících proteiny. Pokud není výsledek přenosu optimální, je nutné upravit čas přenosu, složení použitého transferového pufru nebo v krajním případě zvolit jiný typ membrány.

### **Imunodetekce vybraných proteinů**

Po přenosu proteinů na membránu byla membrána inkubována 2 hod v 5% BSA v TBS 1x nebo v mléce. Během této doby se molekuly BSA nebo mléka naváží na všechna místa na membráně, kde není přítomen protein a zabrání tak nespecifickému navázání protilátky na povrch membrány. Kromě BSA a mléka se jako blokovací agens může využívat kasein, hemoglobin anebo syntetické neživočišné proteiny. Také mohou být aplikovány speciální neiontové detergenty, jako je např.: Triton X 100 nebo Tween 20. Tyto detergenty však neobsazují volná vazebná místa, ale zabraňují nespecifické vazbě bílkovin na membránu (Glatz Z, 1995; G-Biosciences).

Poté byla na membránu nanášena primární monoklonální protilátka proti danému proteinu. Primární protilátka proti  $\beta$ -aktinu pocházela z myši a byla ředěna mlékem nebo BSA v poměru 1:2000 nebo 1:5000. Protilátka proti Beclinu-1 a LC3-II A/B pocházela z králíka a byla ředěna mlékem nebo BSA v poměru 1:1000. Inkubace probíhala 24 hod při 4°C. Po odstranění primární protilátky byly membrány promývány 2x po dobu 15 min v TBST a poté 1x 15 min v TBS. Na membránu byla poté nanášena sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou. Sekundární protilátka byla ředěna mlékem nebo BSA v poměru 1:2000 pro  $\beta$ -aktin a 1:1000 pro Beclin-1 a LC3-II A/B. Inkubace probíhala 1 hod při laboratorní teplotě.

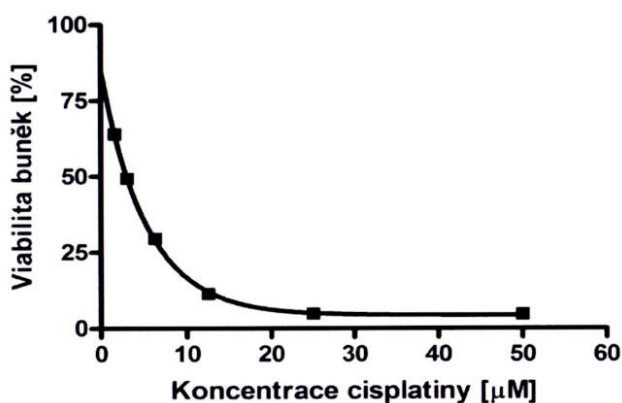


Po odstranění sekundární protilátky byly membrány opět promývány 2x po dobu 15 min v TBST a poté 1x 15 min v TBS. Nakonec byl na membrány nanesen chemiluminiscenční substrát pro křenovou peroxidázu. K vizualizaci výsledků byl použit přístroj Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, USA). Intenzita jednotlivých bandů byla vyhodnocena denzitometricky. Výsledky pro proteiny Beclin-1 a LC3-II A/B byly korelovány s hodnotami získanými pro  $\beta$ -aktin. Tento protein byl zvolen jako kontrola loadingu, neboť jeho exprese by neměla být ovlivněna zvoleným způsobem ošetření buněk a je tedy ve všech vzorcích stejná (Bao L., 2015). Kromě  $\beta$ -aktinu se jako kontrola loadingu často používá např. alfa a beta tubulin, cyklooxygenáza IV, lamin B1, GAPDH atd. (Abcam). Jejich použití závisí na povaze testovaných vzorků a také na velikosti zkoumaných proteinů.

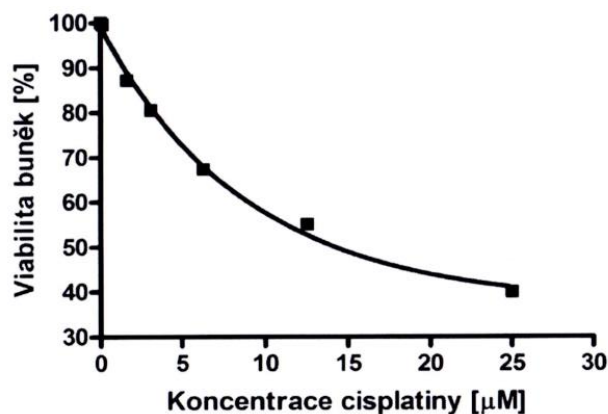
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 MTT test

Ovariální nádorové buňky A2780 a od nich odvozené buňky rezistentní k cisplatině A2780cisR byly ošetřeny cisplatinou (0,1 – 50  $\mu\text{M}$ ) a inkubovány 72 hod při 37 °C. Tato doba je optimální pro vniknutí cisplatinu do jádra a zajištění jejích účinků (Lišková B., 2012). Pro zjištění citlivosti buněk k cisplatině byl proveden MTT test, jehož princip je shrnutý v předcházející kapitole Metody. Výsledkem tohoto testu byly grafy závislosti viability buněk [%] na koncentraci cisplatinu [ $\mu\text{M}$ ]. Grafy byly sestaveny jak pro buňky A2780 (Graf 1), tak i pro buňky A2780cisR se získanou rezistencí k cisplatině (Graf 2). Následně byly z rovnice regresní křivky těchto grafů vypočítány hodnoty  $\text{IC}_{50}$ , které jsou pro obě buněčné linie uvedeny v Tabulce 1.  $\text{IC}_{50}$  udává koncentraci sloučeniny [ $\mu\text{M}$ ], při níž testovaná chemikálie způsobí smrt 50 % buněk.



Graf 1 - Graf závislosti viability buněk (%) na koncentraci cisplatinu ( $\mu\text{M}$ ) pro buňky A2780



Graf 2 - Graf závislosti viability buněk (%) na koncentraci cisplatinu ( $\mu\text{M}$ ) pro buňky A2780cisR

Tabulka 1 – Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro buňky A2780 a rezistentní buňky A2780cisR

Buňky	Průměr ( $\mu\text{M}$ )	Směrodatná odchylka
A2780	4,85	$\pm 0,09$
A2780cisR	15,86	$\pm 1,63$

Na první pohled je patrné, že procento přežívajících buněk klesá v závislosti na koncentraci cisplatinu u obou buněčných linií. Typický je strmější průběh křivky u buněk A2780 oproti křivce u buněk A2780cisR, která má pozvolnější průběh. Získané výsledky potvrzují, že A2780cisR buňky jsou rezistentní k cisplatině a že k vyvolání cytotoxického účinku léčiva jsou zapotřebí několikanásobně vyšší koncentrace cDDP než u A2780 buněk. U citlivé linie A2780 vyvolala průměrná koncentrace cisplatinu  $4,85 \pm 0,09 \mu\text{M}$  smrt 50% buněk, zatímco u rezistentní linie A2780cisR bylo usmrcení 50% buněk způsobeno průměrnou koncentrací cisplatinu  $15,86 \pm 1,63 \mu\text{M}$ . Z uvedených hodnot je patrné, že účinky cisplatinu jsou více než třikrát vyšší u buněk A2780 v porovnání s rezistentní linií.

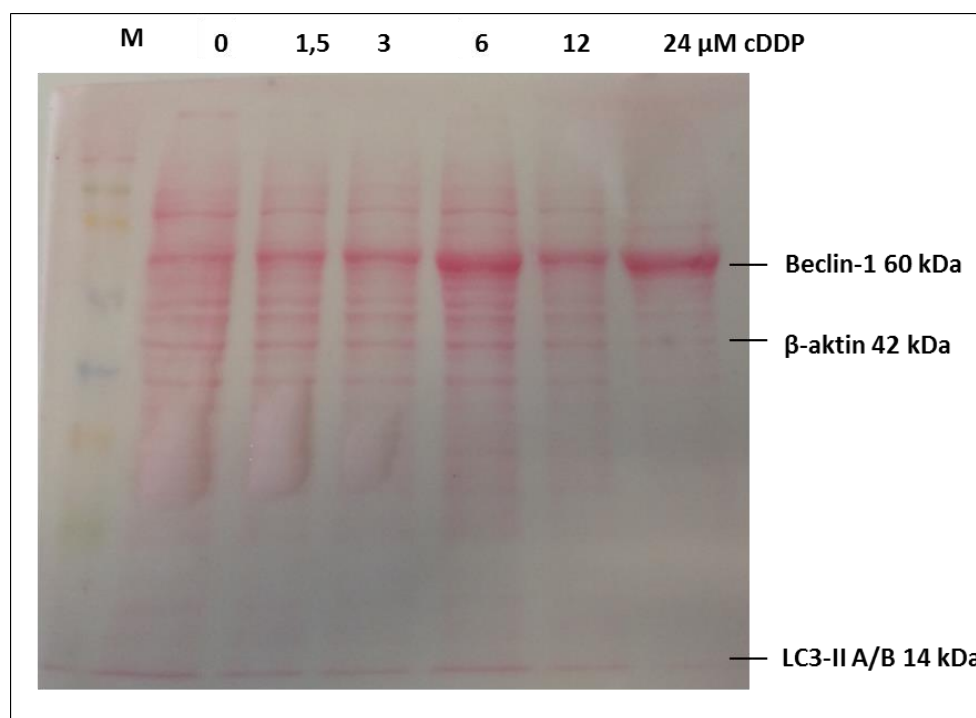
Získané výsledky jsou v souladu s poznatky dostupnými v odborné literatuře. Např. dle článku A. Kozubíka a kol. (2005) se hodnota  $IC_{50}$  u buněk A2780 pohybovala okolo  $1,34 \mu\text{M}$  a u rezistentních buněk (A2780cisR) činila  $24,23 \mu\text{M}$ . Tyto hodnoty byly získány po 72 hod působení cisplatinu. Ve studii dalších českých vědců vyvolala průměrná koncentrace cisplatinu  $1,6 \pm 0,03 \mu\text{M}$ , respektive  $2,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$  smrt u 50% buněk A2780, zatímco u rezistentní linie A2780cisR bylo usmrcení 50% buněk způsobeno průměrnou koncentrací cisplatinu  $24,7 \pm 3,3 \mu\text{M}$ , respektive  $18,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$  po 72 hod působení (Lišková B, 2012; Olivová R., 2012). Na základě získaných výsledků byly určeny koncentrace cisplatinu, jimiž byly obě buněčné linie ošetřeny před přípravou proteinových extraktů pro imunodetekci proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B. Pro tento účel byly vybrány koncentrace cisplatinu  $1,5 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$ ,  $6 \mu\text{M}$ ,  $12 \mu\text{M}$  a  $24 \mu\text{M}$ .

## 5.2 SDS-PAGE a Western blot

Vlastnímu Western blotu předcházela separace proteinů pomocí SDS-PAGE. Jelikož tato práce je zaměřena na experimenty s proteiny malé a střední velikosti (Beclin-1 a LC3-II A/B), byla nejprve optimalizována velikost pórů a zesíťování gelu tak, aby mohlo být provedeno testování obou proteinů na jednom gelu. V rámci optimalizace separace byly použity dva druhy dělicího gelu a to 12% nebo 15% gel, poměr akrylamidu (AA) ku bisakrylamidu (Bis) 19:1 nebo 29:1. Pomocí 10% gelů jsou ideálně separovány středně velké proteiny (molekulová hmotnost 50-100 kDa), kdežto 15% gely jsou vhodné k separaci malých proteinů (molekulová hmotnost  $\leq 20$  kDa; M. Kinter, 2000). Proto byl pro separaci autofagických proteinů Beclin-1 (60 kDa) a LC3-II A/B (14 kDa), které chceme dále detekovat, používán 12% gel, poměr AA:Bis 29:1, který poskytuje vhodnější rozdělení těchto proteinů v rámci jednoho gelu. Jako kontrola loadingu byl použit  $\beta$ -aktin (42 kDa), který představuje produkt tzv. house keeping genů vyskytujících se ve všech typech buněk. Jeho exprese by neměla být ovlivněna zvoleným způsobem ošetření buněk a je tedy ve všech vzorcích stejná (Bao L., 2015).

Po přenesení proteinů z gelu na membránu byly proteiny dále vizualizovány obarvením v Ponceau S. Ponceau S se běžně používá k nespecifickému reverzibilnímu obarvení proteinů, kterým propůjčuje červené zbarvení. Citlivost barvení v Ponceau S je přibližně 2x větší než za použití dalšího běžně používaného barviva Coomassie brilliant blue (Káš J., 2006). Vizualizace proteinů pomocí Ponceau slouží jednak k ověření správného transferu proteinů z gelu na membránu, tak také poskytuje informaci o celkovém množství proteinů ve vzorku. Přebytečné barvivo bylo následně z membrány odstraněno několikanásobným promytím v deionizované vodě, čímž došlo k odstranění pozadí a zvýraznění jednotlivých pruhů obsahujících proteiny. Kromě proteinů je na membráně také patrný kolorimetrický marker proteinové velikosti, který umožňuje snadné a přesné určení polohy proteinů na polyakrylamidovém gelu.

Reprezentativní příklad takto obarvené membrány je zobrazen níže (Obr. 11). Pokud není výsledek přenosu optimální, je nutné upravit čas přenosu, složení použitého transferového pufru nebo v krajním případě zvolit jiný typ membrány. Pro naše účely byla vybrána PVDF membrána a čas přenosu byl stanoven na 40 min.

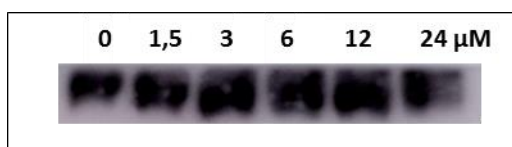


Obr. 11 – PVDF membrána s obarvenými proteiny, které byly rozděleny pomocí 12% gelu, poměr AA:Bis 29:1 (Dráhy: M – marker, 0 - neošetřený vzorek buněk A2780; dále vzorky buněk A2780 ošetřené 1,5; 3; 6; 12 a 24 μM cisplatinou)

### 5.3 Imunodetekce vybraných proteinů

Před samotnou imunodetekcí proteinů pomocí protilátek, byl povrch membrány blokován v BSA nebo mléce. Membrána byla inkubována 2 hod v 5% BSA v TBS 1x (Obr. 12) nebo v mléce (Obr. 13 a 14). V závislosti na tom, pak byly dále ředěny primární i sekundární protilátky buď mlékem, nebo BSA. Nejdříve bylo blokování membrány prováděno pomocí BSA, jak doporučoval výrobce protilátky proti β-aktinu. U dalších proteinů však nebylo při použití BSA dosaženo reprezentativních výsledků, proto bylo nadále používáno mléko jak na blokování povrchu membrány, tak na ředění protilátek.

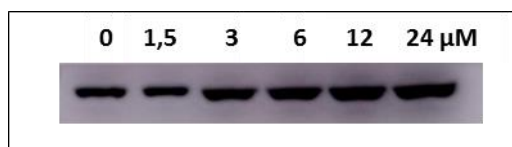
Dále bylo optimalizováno ředění primární protilátky proti β-aktinu. Ta byla nejprve ředěna BSA nebo mlékem v poměru 1:2000. Sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou byla ředěna BSA nebo mlékem v poměru 1:2000. Po vizualizaci pomocí chemiluminiscenčního substrátu však byly na membráně viditelné proužky odpovídající tomuto proteinu příliš intenzivní a špatně ohraničené (Obr. 13), proto byla nadále primární protilátka proti β-aktinu ředěna v poměru 1:5000 (Obr. 14). Primární i sekundární protilátky proti β-aktinu pocházely z myši. Všechny výsledky jsou uvedené pro buněčnou linii A2780cisR. U linie A2780 byly výsledky obdobné.



Obr. 12 – PVDF membrána, jejíž povrch byl blokován v BSA, ředění primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu 1:2000 (Dráhy: 0 - neošetřený vzorek buněk A2780; dále vzorky buněk A2780 ošetřené 1,5; 3; 6; 12 a 24  $\mu$ M cisplatinou)



Obr. 13 – PVDF membrána, jejíž povrch byl blokován v mléce, ředění primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu 1:2000 (Dráhy: 0 - neošetřený vzorek buněk A2780; dále vzorky buněk A2780 ošetřené 1,5; 3; 6; 12 a 24  $\mu$ M cisplatinou)

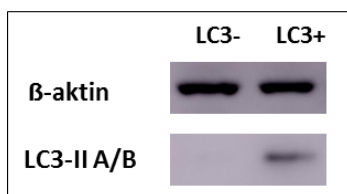


Obr. 14 – PVDF membrána, jejíž povrch byl blokován v mléce, ředění primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu 1:5000 (Dráhy: 0 - neošetřený vzorek buněk A2780; dále vzorky buněk A2780 ošetřené 1,5; 3; 6; 12 a 24  $\mu$ M cisplatinou)

Primární protilátka proti autofagickému proteinu Beclin-1 a LC3-II A/B byla ředěna BSA nebo mlékem v poměru 1:1000. Sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou byla ředěna BSA nebo mlékem v poměru 1:1000 pro oba proteiny. Primární i sekundární protilátky proti Beclinu-1 a LC3-II A/B pocházely z králíka. Intenzita jednotlivých bandů byla vyhodnocena denzitometricky. Výsledky pro proteiny Beclin-1 a LC3-II A/B byly korelovány s hodnotami získanými pro  $\beta$ -aktin. Tento protein se používá jako kontrola loadingu, neboť jeho exprese by neměla být ničím ovlivněna a je tedy ve všech vzorcích stejná (Bao L., 2015).

K zjištění, zda u studovaných buněčných linií vůbec došlo k vyvolání autofagie a autofagický protein LC3-II byl exprimován, byly použity komerčně dodávané LC3 II- a LC3 II+ kontroly (Obr. 15). Jako LC3 II- jsou označeny extrakty HeLa buněk, které nebyly nijak ovlivňovány. Tudíž u buněk za normálních podmínek není vyvolána autofagická odpověď a daný autofagický protein se vůbec neexprimuje. Proto se na gelu v první dráze u LC3-II A/B proteinu nenachází žádný proužek. LC3 II+ kontroly jsou naopak extrakty HeLa buněk, které byly ovlivněny chloroquinem. Tato látka vyvolává autofagii, proto je na gelu u LC3-II A/B proteinu ve druhé dráze patrný proužek. Výsledky pro LC3-II A/B byly korelovány s výsledky pro  $\beta$ -aktin, který slouží jako kontrola loadingu,

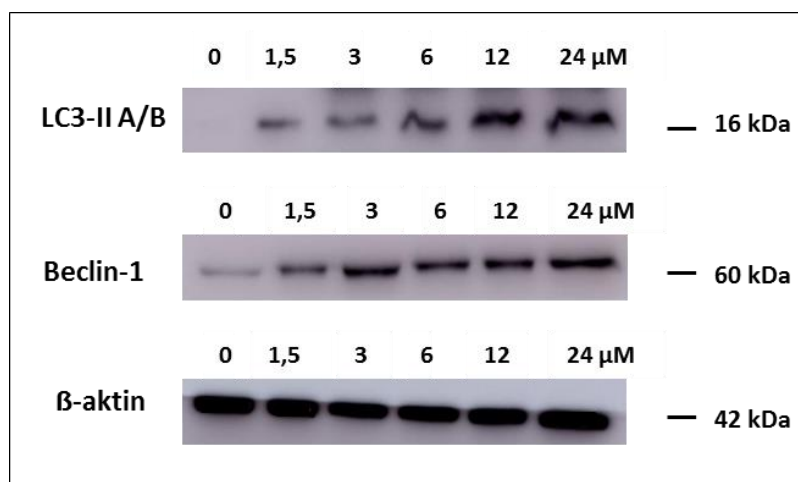
neboť jeho exprese je ve všech vzorcích stejná (Bao L., 2015), což jsme také potvrdily během našich experimentů.



Obr. 15 – Kontrolní extrakty z HeLa buněk, jako kontrola loadingu byl použit β-aktin

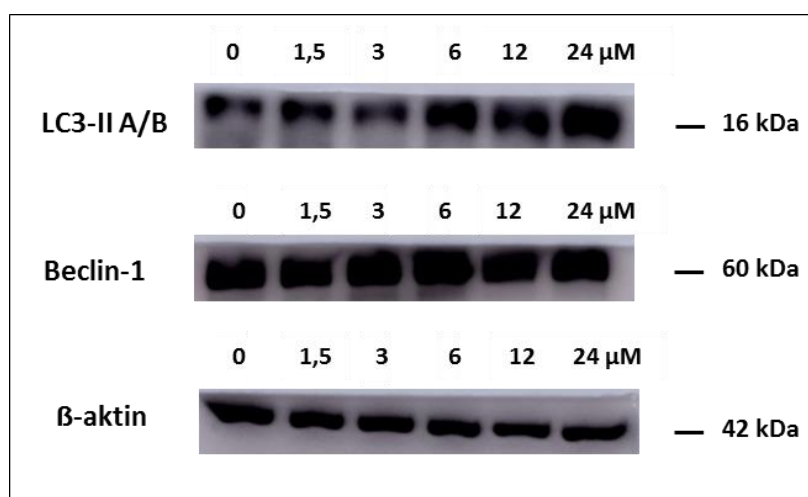
Cílem této práce byl výzkum exprese autofagických proteinů LC3-II A/B a Beclin-1 v buňkách citlivých a rezistentních k působení cDDP. Srovnání hladin exprese těchto proteinů u obou buněčných linií by mohlo přispět k potvrzení nebo vyvrácení hypotézy, zda by mohla být autofagická odpověď zodpovědná za vyvolání získané rezistence A2780 buněk.

Úroveň autofagie byla porovnávána u buněk A2780 citlivých k cisplatině a A2780cisR rezistentních k tomuto léčivu měřením exprese proteinů LC3-II A/B a Beclin-1. U buněčné linie A2780 (Obr. 16) byly úspěšně detekovány oba autofagické proteiny, jak Beclin-1, tak také LC3-II A/B. V prvních dráhách se u všech proteinů nachází extrakt z buněk, které nebyly ošetřeny cisplatinou. I přesto byla u buněk vyvolaná autofagická odpověď a u proteinu Beclin-1 je v první dráze detekovatelný proužek o nízké intenzitě, což může být způsobeno např. mírným stresem buněk, který byl vyvolán při jejich sklizení trypsinizací apod. Do 2. až 6. dráhy byly aplikovány extrakty ošetřené cisplatinou o koncentraci 1,5; 3; 6; 12 a 24 μM. U proteinu LC3-II A/B i Beclin-1 je se zvyšující se koncentrací cisplatinou patrná i zvyšující se intenzita jednotlivých bandů. To odpovídá zvyšující se úrovni exprese obou proteinů. Výsledky pro proteiny Beclin-1 a LC3-II A/B byly korelovány s výsledky pro β-aktin, který slouží jako kontrola loadingu, neboť jeho exprese je ve všech vzorcích stejná (Bao L., 2015).



Obr. 16 – Imunodetekce apoptických proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B a β-aktinu, který byl použit jako kontrola loadingu u buněčné linie A2780 (Dráhy: 0 - neošetřený vzorek buněk A2780; dále vzorky buněk A2780 ošetřené 1,5; 3; 6; 12 a 24 μM cisplatinou)

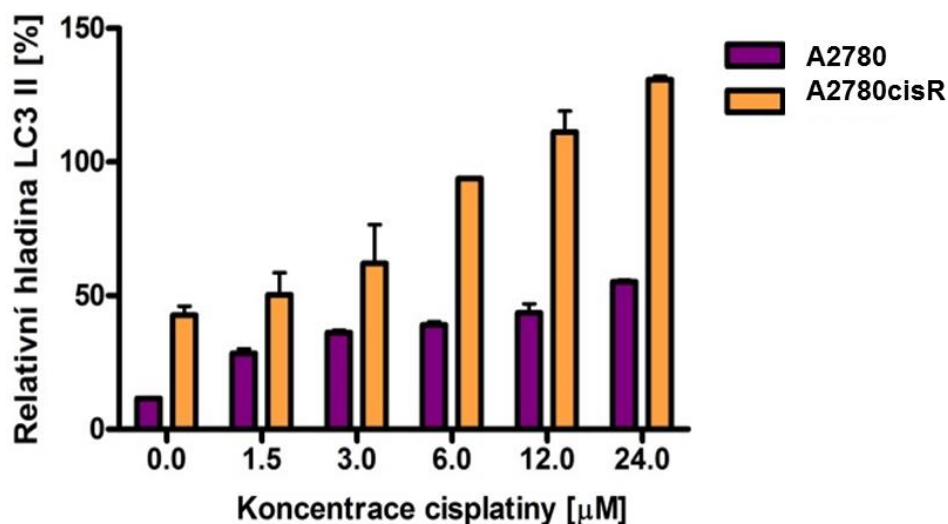
U rezistentní buněčné linie A2780cisR (Obr. 17) byly taktéž detekovány autofagické proteiny Beclin-1 a LC3-II A/B. V prvních drahách se u všech proteinů nachází extrakt z buněk, které nebyly ošetřeny cisplatinou. Protože byla rezistence A2780cisR buněk k cisplatině vyvolána dlouhodobým přidáváním cisplatinou o nízké koncentraci, můžeme i u neošetřeného vzorku v první dráze pozorovat intenzivní band autofagických proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B. Ve 2. až 6. dráze, kam byly aplikovány extrakty buněk ošetřených cisplatinou o koncentraci 1,5; 3; 6; 12 a 24  $\mu\text{M}$ , je patrná výrazná exprese proteinu Beclin-1, která se již téměř nemění se zvyšující koncentrací cDDP. To také potvrzuje Graf 4, kde jsou uvedeny relativní hladiny exprese Beclinu-1 u citlivých i rezistentních buněk. U proteinu LC3-II A/B dochází se zvyšující se koncentrací cisplatinou k postupnému nárůstu exprese tohoto proteinu. Výsledky pro proteiny Beclin-1 a LC3-II A/B byly korelovány s výsledky pro  $\beta$ -aktin, který slouží jako kontrola loadingu, neboť jeho exprese je ve všech vzorcích stejná (Bao L., 2015).



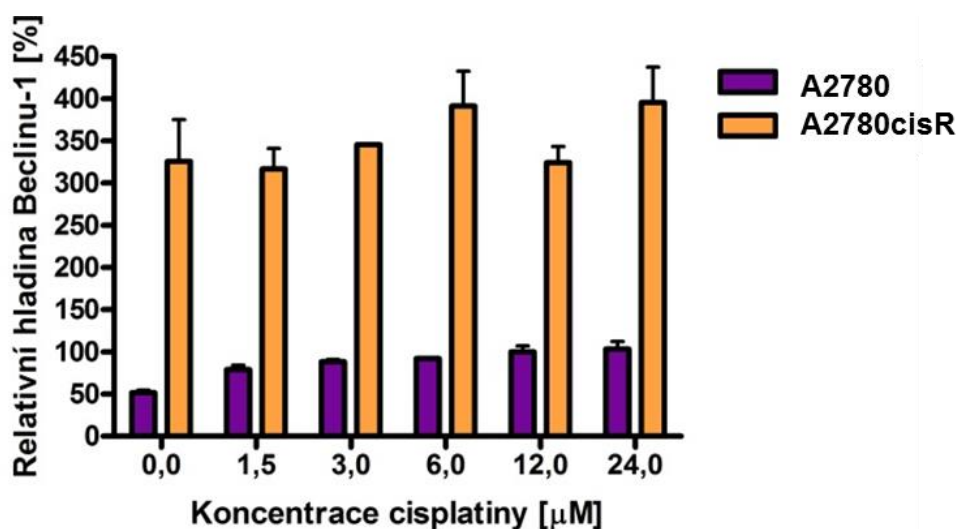
Obr. 17 – Imunodetekce apoptických proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B a  $\beta$ -aktinu, který byl použit jako kontrola loadingu u rezistentní buněčné linie A2780cisR (Dráhy: 0 - neošetřený vzorek buněk A2780; dále vzorky buněk A2780 ošetřené 1,5; 3; 6; 12 a 24  $\mu\text{M}$  cisplatinou)

K určení přesné míry exprese proteinu Beclin-1 a LC3-II A/B byla intenzita jednotlivých bandů vyhodnocena denzitometricky. Následně byly sestaveny grafy relativních hladin exprese proteinu v závislosti na koncentraci cisplatinou jak pro Beclin-1 (Graf 3), tak pro LC3-II A/B (Graf 4). Na těchto grafech je dobře patrný rozdíl v expresi jednotlivých autofagických proteinů u buněčné linie A2780 v porovnání s rezistentní buněčnou linií A2780cisR.





Graf 3 - Relativní hladiny exprese proteinu LC3-II A/B v závislosti na koncentraci cisplatinu u linie A2780 a A2780cisR



Graf 4 - Relativní hladiny exprese proteinu Beclin-1 v závislosti na koncentraci cisplatinu u linie A2780 a A2780cisR

Jak je patrné na Obr. 16 nebo 17 a na obou grafech, cisplatin vyvolala expresi autofagických proteinů LC3-II A/B a Beclin-1 u obou buněčných linií. U A2780cisR buněk se projevila vyšší úroveň exprese proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B v porovnání s A2780 buňkami. Obzvláště úroveň exprese Beclinu-1, byla u rezistentních buněk několikanásobně vyšší než u buněk citlivých k účinkům cisplatinu. Zatímco exprese LC3-II A/B narůstala se zvyšující se koncentrací cDDP u obou buněčných linií, míra exprese Beclinu-1 se zvyšovala s narůstající koncentrací cisplatinu pouze u buněk A2780. U buněk A2780cisR se relativní hladina exprese Beclinu-1 pohybovala mezi 300 – 400 %.



Získané výsledky odpovídaly výsledkům uvedeným v odborné literatuře. Například práce Xia Yin (2013) se mimo jiné zabývala expresí proteinu LC3-II A/B u buněk A2780 a A2780cisR, které byly ošetřeny cDDP o koncentraci 10, 15, 20 a 30 µg/ml. U rezistentních buněk byla exprese LC3-II A/B několikanásobně vyšší než u buněk citlivých k cDDP. U rezistentní i citlivé linie se exprese tohoto proteinu zvyšovala se zvyšující se koncentrací cisplatin, stejně jako v našem případě. Ve studii L. Bao (2015) byla porovnávána hladina exprese LC3-II A/B a Beclinu-1 u buněk A2780 a A2780cisR po 24 hod ošetření cisplatinou o koncentraci 1,5; 3 a 6 µg/ml. Cisplatin indukovala expresi LC3-II A/B a Beclinu-1 u obou buněčných linií. Rezistentní buňky A270cisR vykazovaly vyšší úroveň exprese obou proteinů v porovnání s citlivými buňkami A2780. Tyto výsledky byly navíc doplněny analýzou elektronovým mikroskopem, která potvrdila větší výskyt autofagozomů u rezistentních buněk než u buněk citlivých. V článku je uvedeno, že exprese Beclinu-1 se u obou linií zvyšovala se zvyšující se koncentrací cisplatin, zatímco exprese LC3-II A/B se neměnila. V našem případě tomu bylo však naopak. Pro přesnější posouzení, jestli byla autofagie v buňkách indukována, by bylo dobré získané výsledky potvrdit ještě jinou nezávislou metodou, např. sledováním exprese mRNA pro protein zájmu nebo knock outem cílového genu zájmu apod.

Výsledky této práce potvrzují, že cisplatin vyvolává expresi autofagických proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B v ovariálních nádorových buňkách. Dále ukazují, že autofagická odpověď je vyšší u rezistentních buněk A2780cisR než u buněk A2780. Proto jsem došla k závěru, že autofagie má pravděpodobně u nádorových buněk ochrannou roli, kdy umožňuje jejich přežívání, působí proti toxickým účinkům cisplatin a zřejmě významně přispívá při vzniku rezistence k tomuto léčivu. Toto zjištění by dále mohlo dopomoci k dalšímu výzkumu mechanismu biologického účinku působení cDDP. Také by mohlo přispět ke zlepšení léčebné strategie, při níž by u pacientů léčených cisplatinou léková rezistence vůbec nevznikla.

## 6 ZÁVĚR

V diplomové práci jsem se zabývala studiem vlivu vybraných komplexů přechodných kovů na indukci autofagie v lidských nádorových buňkách. V rámci zpracování literární rešerše této závěrečné práce jsem se mimo jiné seznámila s průběhem autofagie u eukaryotických organismů a její rolí během nádorového onemocnění, jež je spojována s rezistencí nádorových buněk k metalofarmakům na bázi platiny. Při experimentech jsem si osvojila techniku práce s kulturami lidských nádorových buněk, seznámila jsem se s provedením MTT testu buněčné viability a také metodami vedoucími k imunodetekci vybraných proteinů.

Cílem této práce byl výzkum exprese autofagických proteinů LC3-II A/B a Beclin-1 v buňkách citlivých a rezistentních k působení cisplatin. Srovnání hladin exprese těchto proteinů u obou buněčných linií by mohlo přispět k potvrzení nebo vyvrácení hypotézy, zda by mohla být autofagická odpověď zodpovědná za vyvolání získané rezistence A2780 buněk k cisplatině. Získané výsledky odpovídají poznatkům uvedeným v odborné literatuře a potvrzují, že cisplatin vyvolává expresi autofagických proteinů Beclin-1 a LC3-II A/B v ovariálních nádorových buňkách. Dále ukazují, že exprese těchto proteinů je vyšší u rezistentních buněk A2780cisR než u buněk A2780. K úplnému potvrzení, že cisplatin indukuje autofagii v ovariálních nádorových buňkách by bylo dobré práci doplnit o mikroskopické pozorování buněk, které by prokázalo přítomnost autofagolysosomů.

Závěrem této práce je, že autofagie má pravděpodobně u nádorových buněk ochrannou roli, kdy umožňuje jejich přežívání, působí proti toxickým účinkům cisplatin a zřejmě významně přispívá při vzniku získané rezistence k tomuto léčivu. Toto zjištění by dále mohlo dopomoci k dalšímu výzkumu mechanismu biologického účinku působení cDDP. Také by mohlo přispět ke zlepšení léčebné strategie, při níž by u pacientů léčených cisplatinou léková rezistence vůbec nevznikla.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Abcam – Loading control guide; dostupné na: <http://www.abcam.com/primary-antibodies/loading-control-guide>, staženo dne: 2.11.2015
2. Bao L. et al. – Induction of autophagy contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells, *Molecular Medicine Reports* (2015); 11: 91-98
3. Berry D. L., Baehrecke Eric H. - Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*, *Cell* (2007); 131(6): 1137–1148
4. Brabec V. - Nové možnosti v léčbě zhoubných nádorů sloučeninami platiny a ruthenia, *Živa* (1998); 4: 148-149
5. Crichton D. – DRAM links autophagy to 53 and programmed cell death, *autophagy* (2007); 3(1): 72-74
6. Cuervo, A. - Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off, *Trends in Endocrinology and Metabolism* (2009); 21: 142-150
7. de Duve CH, Wattiaux R. - Functions of lysosome, *Annual Review of Physiology* (1966); 28: 435– 492.
8. Díaz-Troya S. et al. - The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals, *Autophagy* (2008); 4: 851-865
9. Dvorská M. a kol. - Apoptóza v gynekologii a porodnictví, *Gynekolog* (2008); 4, dostupné na: <http://www.gyne.cz/clanky/2008/408cl1.htm>, staženo 10.2.2016
10. Fadok V. A. et al. - The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes, *Cell Death & Differentiation* (1998); 5(7): 551– 562.
11. Galluzzi L. et al. - Classification of cell death subroutines: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death and Differentiation* (2012); 19, 107–120
12. G-Biosciences - Which Blocking Agent for Western blotting?; dostupné na: <http://info.gbiosciences.com/blog/bid/159273/Which-Blocking-Agent-for-Western-Blotting>, staženo 2.1.2016
13. Glatz Z. - Způsoby a použití přenosu bílkovin z gelů po elektroforéze, *Chemické listy* (1995); 89: 437 - 443
14. Glick, D. et al. - Autophagy: cellular and molecular mechanism, *American Journal of Pathology* (2010); 221: 3-12
15. Gross, A. et al. - Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis, *EMBO Journal* (1998); 17: 3878-3885
16. Gump J. M., Thorburn A. – Autophagy and apoptosis - what's the connection?, *Trends in Cell Biology* (2011); 21(7): 387–392
17. Hayden M. S., Ghosh S. - Shared principles in NF- kappaB signaling, *Cell* (2008); 132(3): 344–362.
18. He C. - Regulation mechanism of and signaling pathways autophagy, *Annual Review of Genetics* (2009); 43: 67–93
19. He S. et al. - Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha, *Cell* (2009); 137: 1100–1111.
20. Chaudhary P. M. et al. - Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-b pathway, *Imunity* (1997); 7: 821-830
21. Cho Y. S. et al. - Phosphorylation-driven assembly of the RIP1–RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation, *Cell* (2009); 137: 1112–1123.

22. Choi K. S. – Autophagy and cancer, *Experimental & Molecular Medicine* (2012); 44:109-120
23. Choubey V. et al. – BECN1 is involved in the initiation of mitophagy, *Autophagy* (2014); 10(6):1105-1119
24. Informační leták k léčivu CISPLATIN "EBEWE", dostupné na: [www.sukl.cz/download/pil/PI80926.doc](http://www.sukl.cz/download/pil/PI80926.doc), staženo 31.3.2016
25. Kaiser R., Haninec P. - Degenerace a regenerace periferního nervu. *Československá fyziologie* (2012); 61(1): 9-14
26. Káš J. a kol. - Laboratorní techniky biochemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze (2005); 1. Vydání: 122. ISBN 80-7080-586-2
27. Kerr J. F. - Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer* (1972); 26(4): 239 – 257.
28. Kinter M., Sherman N. E. - Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry, *Wiley-interscience* (2000); 2. Vydání: 125, ISBN 0-471-32249-0
29. Klener P. jr., Klener P. - Principy systémové protinádorové léčby, Grada Publishing, a.s. (2013); 1–199, ISBN 978-80-247-4171-0
30. Klionsky D. J. et al. - Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, *Autophagy* (2012); 8(4): 445 – 544
31. Kozubík A. a kol. - High effectiveness of platinum(IV) complex with adamantylamine in overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro, *Biochemical Pharmacology* (2005); 69:373-383
32. Lavrik, I. N. - Caspases: pharmacological manipulation of cell death, *Journal of Clinical Investigation* (2005); 115: 2665-2672
33. Levine B., Yuan J. - Autophagy in cell death: an innocent convict?, *Journal of Clinical Investigation* (2005); 115(10): 2679– 2688
34. Levine, B., Klionsky, D. J. - Development by selfdigestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy, *Developmental Cell* (2004); 6: 463–477
35. Li J. et al. - The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis, *Cell* (2012); 150(2): 339–50
36. Lin Y. et al. - Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor- interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation, *Journal of Chemical Biology* (2004); 279(11): 10822–10828
37. Lišková B. a kol. - Cellular Response to Antitumor cis-Dichlorido Platinum(II) Complexes of CDK Inhibitor Bohemine and Its Analogues, *Chemical Research in Toxicology* (2012); 25: 500–509
38. Lozy F. et al. - ERBB2 overexpression suppresses stress-induced autophagy and renders ERBB2-induced mammary tumorigenesis independent of monoallelic *Becn1* loss, *Autophagy* (2014); 10(4):662-676
39. Miki, N. et al. - Simple colorimetric cell-cell adhesion assay using MTT-stained leukemia cells, *The Journal of Immunological Methods* (1993); 164: 255-256
40. Mizushima N. - The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide, *Cell Death & Differentiation* (2005); 12:1535-1541
41. Mizushima N., Komatsu M. - Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell* (2011); 147(4): 728– 741
42. Olivová R. a kol. - Mechanistic insights into toxic effects of a benzotriazole-bridged dinuclear platinum(II) compound in tumor cells, *Inorganica Chimica Acta* (2012); 393:204–211

43. Ondroušková E., Vojtěšek B. - Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách, *Klinická onkologie* (2014); 27: 7-14
44. Ouyang L. et al. - Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Proliferation* (2012); 45(6): 478– 498
45. Pláteník J. - Smrt srdeční a nervové buňky: Ischemicko-reperfusní poškození, Excitotoxicita, Neurodegenerace, přednáška k předmětu Patobiochemie 3, obor všeobecné lékařství, 1. lékařská Univerzita Karlova, Praha (2011); dostupné na: <http://ulbld.lf1.cuni.cz/prednasky-ke-stazeni>; staženo: 19.2.2016
46. Puissant, A. et al. - Targeting autophagy to fight hematopoietic malignancies, *Cell Cycle* (2010); 9: 3470-3478
47. Riss T. L. et al. - Cell Viability Assays, *Assay Guidance Manual* (2013); 261 – 265; 272
48. Scaffidi, C. et al. - Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways, *EMBO Journal* (1998); 17: 1675--1687
49. Shi M. et al. - Calpain, Atg5 and Bak play important roles in the crosstalk between apoptosis and autophagy induced by influx of extracellular calcium, *Apoptosis* (2013); 18(4):435-451
50. Sun X., Tang D. - HMGB1-dependent and -independent autophagy, *Autophagy* (2014); 10(10): 1873–1876
51. Vandenabeele P. et al. - Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2010); 11(10): 700– 714
52. Wang J, Wu G. S.- Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells, *The journal of biological chemistry* (2014); 289(24): 17163–17173
53. Weil M. et al. - Is programmed cell death required for neural tube closure?, *Current Biology* (1997); 7: 281-- 284.
54. Xia Y. et al. - Regulation of LC3-Dependent Protective Autophagy in Ovarian Cancer Cells by Protein Phosphatase 2A, *International Journal of Gynecological Cancer* (2013); 23: 630-641
55. Yang Ch. – S. et al. - The Autophagy Regulator Rubicon Is a Feedback Inhibitor of CARD9-Mediated Host Innate Immunity, *Cell Host & Microbe* (2012); 11(3): 277– 289
56. Yu L. et al. - Induction of autophagy counteracts the anticancer effect of cisplatin in human esophageal cancer cells with acquired drug resistance, *Cancer Letters* (2014); 355: 34-45
57. Yue Z. et al. - Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2003); 100: 15077-15082
58. Zou H. et al. - Apaf- 1, a human protein homologous to *C. elegans* CED- 4, participates in cytochrome c- dependent activation of caspase- 3, *Cell* (1997); 90(3): 405– 413