

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Lysozomální sekvestrace slabých hydrofobních bází a lysozomální biogeneze**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Tereza Golková</b>
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2021

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Golková
Název práce	Lysozomální sekvestrace slabých hydrofobních bází a lysozomální biogeneze
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Předložená diplomová práce pojednává o lysozomální sekvestraci slabých hydrofobních bází a lysozomální biogenezi. V teoretické části je popsána nádorová buňka včetně jejích charakteristických vlastností, jsou zde uvedeny mechanismy mnohočetné lékové rezistence, dále jsou v teoretické části charakterizovány lysozomy, léková rezistence a vlastnosti vybraných protinádorových léčiv. Experimentální část této práce je zaměřena na lysozomální biogenezi indukovanou lysozomální sekvestrací slabých hydrofobních bází nanomolárních koncentrací. Během laboratorní práce bylo zjištěno, že u použité buněčné linie A549 nedochází vlivem lysozomální sekvestrace nanomolárních koncentrací slabých hydrofobních bází k biogenezi lysozomů, nýbrž bylo zjištěno, že se jedná o změnu průběhu buněčného cyklu, kdy se tyto buňky nachází ve fázi G2 buněčného cyklu.</p>
Klíčová slova	Lysozomy, lysozomální sekvestrace, mnohočetná léková rezistence, nádorová buňka, slabé hydrofobní báze, lysozomální biogeneze
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tereza Golková
Title of thesis	Lysosomal sequestration of weak hydrophobic bases and lysosomal biogenesis
Type of thesis	diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>The presented diploma thesis deals with lysosomal sequestration of weak hydrophobic bases and lysosomal biogenesis. The theoretical part describes the tumor cell, including its characteristic properties, there are mechanisms of multiple drug resistance, the theoretical part also characterizes lysosomes, drug resistance and properties of selected anticancer drugs. The experimental part of this work is focused on lysosomal biogenesis induced by lysosomal sequestration of weak hydrophobic bases of nanomolar concentrations. During laboratory work, it was found that the used cell line A549 does not undergo lysosome biogenesis due to lysosomal sequestration of nanomolar concentrations of weak hydrophobic bases, but it was found that this changes the cell cycle, when these cells are in the G2 phase of the cell cycle.</p>
Keywords	Lysosomes, lysosomal sequestration, multiple drug resistance, tumor cell, weak hydrophobic bases, lysosomal biogenesis
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Bc. Tereza Golková

V prvé řadě bych chtěla poděkovat docentovi Petru Mlejnkovi, kterému patří největší dík, nejen kvůli tomu, že mi umožnil pod jeho vedením pracovat na tomto tématu, ale také díky jeho neuvěřitelné trpělivosti a pevným nervům mě dovedl do zdárného konce. Dále bych ráda poděkovala magistru Jakubu Havláskovi, za pomoc v laboratoři a za cenné rady, které mi opakoval, dokud jsem si je nezapamatovala. Rovněž bych chtěla poděkovat doktoru Petru Doleželovi za pomoc při měření vzorků a také za pomoc při problémech s cytometrem. Další dík patří Bohdaně Machalové za přípravu roztoků nezbytných pro experimenty. Rovněž bych ráda poděkovala celému kolektivu Ústavu normální anatomie za přátelskou atmosféru, díky které bylo snadné pracovat na experimentální části diplomové práce. V neposlední řadě patří velký dík mé rodině, partnerovi a přátelům za podporu. Speciální dík patří Magdaléně Zvonkové a Anně Valníčkové, bez nichž bych se tak daleko nedostala a jejichž nakopávání a útěcha mi pomáhala ve chvílích, kdy jsem měla pocit, že to nezvládnu.

# Obsah

Seznam použitých zkratek.....	8
1 Úvod .....	10
2 Teoretická část .....	11
2.1 Nádorová buňka .....	11
2.1.1 Genomová nestabilita .....	12
2.1.2 Soběstačnost v růstových signálech.....	13
2.1.3 Necitlivost vůči inhibici růstových signálů.....	16
2.1.4 Únik před programovanou buněčnou smrtí .....	18
2.1.5 Neomezený replikační potenciál .....	20
2.1.6 Bioenergetika nádorové buňky .....	21
2.1.7 Angiogeneze.....	22
2.1.8 Metastáze.....	24
2.1.9 Nádor-podporující zánět .....	24
2.1.1 Únik před imunologickým dohledem .....	25
2.2 Možnosti léčby nádorového onemocnění .....	26
2.3 Mnohočetná léková rezistence .....	28
2.3.1 Mutace molekulárního cíle léčiva .....	30
2.3.2 Změna regulace apoptózy.....	31
2.3.3 Zvýšený odtok léčiva - lékové transportéry .....	32
2.3.4 Narušení DNA reparačních mechanismů .....	33
2.3.5 Buněčná léková rezistence – lysozomální sekvestrace .....	34
2.4 Lysozomy.....	35
2.4.1 Vlastnosti a funkce lysozomů.....	36
2.4.2 Biogeneze lysozomů.....	37
2.4.3 Lysozomální proteiny .....	38
2.4.4 LAMP 1 .....	39
2.4.5 LAMP 2 .....	40
2.4.6 (H <sup>+</sup> )-ATPasa.....	41
2.5 Lysozomální sekvestrace slabých hydrofobních bází .....	42
2.6 Chemoterapeutika v boji proti rakovině .....	44
2.6.1 Cílená chemoterapie .....	45
2.6.2 Monoklonální protilátky.....	45
2.6.3 Nízkomolekulární inhibitory.....	46
2.6.4 Imatinib .....	47

2.6.5	Necílená chemoterapie .....	48
2.6.6	Alkylační činidla .....	49
2.6.7	Antimetabolity .....	49
2.6.8	Rostlinné alkaloidy a inhibitory topoizomeras.....	50
2.6.9	Antracykliny.....	51
2.6.10	Doxoubicin .....	52
2.6.11	Mitoxantron .....	53
3	Experimentální část.....	55
3.1	Obecné informace k experimentální části .....	55
3.1.1	Použité chemikálie a roztoky .....	55
3.1.2	Použitá média.....	55
3.1.3	Použitý materiál .....	55
3.1.4	Použité přístroje .....	56
3.1.5	Použitá buněčná linie .....	56
3.2	Metody.....	57
3.2.1	Stanovení živých buněk pomocí TMRE .....	57
3.2.2	Stanovení buněčného cyklu a jeho analýza .....	57
3.2.3	Extrakce celkových proteinů .....	58
3.2.4	Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové.....	58
3.2.5	Stanovení exprese proteinů LAMP1, V-ATPasa, LAMP2 pomocí metody western blotting.....	59
3.2.6	Chemiluminiscenční detekce specifických proteinu .....	60
3.2.7	Stanovení počtu lysozomů. ....	61
3.2.1	Stanovení akumulace léčiva v lysozomech .....	62
4	Výsledky .....	63
4.1	Analýza exprese markerových proteinů.....	64
4.2	Stanovení počtu lysozomů. ....	66
4.1	Sekvestrační kapacita lysozomů.....	68
4.2	Analýza buněčného cyklu.....	70
5	Diskuze .....	72
6	Závěr.....	75
7	Seznam použité literatury .....	76

## Seznam použitých zkratek

ABC – ATP binding cassette

AML – akutní myeloidní leukemie

CLEAR – Coordinated Lysosomal Expression and Regulation = koordinovaná lysozomální exprese a regulace

CLL – chronická lymfatická leukemie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DXR – doxorubicin

ERCCG1 - excision repair cross-complementation group 1 = excizní reparační křížově komplementační skupina 1

GADPH – Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa

MAPK – mitogen-activated protein kinases = MAP kinasa

MDR – multidrug resistance = mnohočetná léková rezistence

MMR – mismatch reparace

MRP1 – multidrug-resistance-associated protein 1 = protein asociovaný s MDR

MTIF – mitochondrial translational initiation factor = mitochondriální iniciační translační faktor

mTOR1 – mammalian target of rapamycin complex 1 = savčí cíl pro rapamycinového komplexu 1

MTX – mitoxantron

PDGF – Platelet Derived Growth Factor = růstový faktor odvozený z krevních destiček

pRB – retinoblastomový protein

ROS – Reactive Oxygen Species = reaktivní formy kyslíku

STI – imatinib

TFE3 – Transkripční faktor E3



TFEB – transkripční faktor EB

TGN – trans Golgiho network = trans golgiho síť

TKIs – inhibitory tyrosinkinas

TP53 – tumor protein p53

VEGF – Vascular endothelial growth factor = vaskulární endoteliální růstový faktor

# 1 Úvod

Chemoterapie zůstává primární metodou léčby různých lidských malignit. Problémem je ovšem mnohočetná léková rezistence (MDR), což je jev, při kterém nádorové buňky vykazují rezistenci vůči strukturně a funkčně nesouvisejícím protinádorovým léčivům. Jedná se o primární překážku při léčbě rakoviny za použití chemoterapie.

Protože se MDR považuje za jednu z hlavních příčin omezeného úspěchu mnoha chemoterapeutik, existuje naléhavá potřeba odhalit molekulární mechanismy, které jsou základem rezistence nádorových buněk vůči používané léčbě. Jedním z možných mechanismů rezistence nádorových buněk je lysozomální akumulace použitého léčiva.

Lysozomy jsou kyselé intracelulární organely obsahující různé kyselé hydrolasy, které hrají klíčovou roli při rozpadu makromolekul, včetně nukleových kyselin, proteinů, lipidů a polysacharidů. Kromě toho bylo prokázáno, že lysozomy se aktivně účastní různých buněčných procesů, včetně recyklace organel, fagocytózy bakterií a virů, exocytózy i apoptózy. Bylo zjištěno, že lysozomální biogeneze je vyvolána mimo jiné translokací transkripčního faktoru EB (TFEB) z cytoplazmy do jádra. TFEB je hlavní regulátor, který aktivuje transkripci genů zodpovědných za biogenezi a funkci lysozomů.

Ukázalo se, že TFEB zprostředkovaná lysozomální biogeneze je indukována různými stimuly, jako je aberantní skladování lysozomů, hladovění buněk, porušení nízkého pH v lysozomu např. farmakologickou inhibicí V-ATPasy, inhibicí klíčového regulátoru růstu komplexu mTOR 1. Nově bylo zjištěno, že stres může vyvolat i sekvestrace slabých hydrofobních bází nanomolárních koncentrací. Stres indukovaný akumulací slabých hydrofobních bází v nanomolárních koncentracích aktivuje TFEB, což jak už bylo řečeno, spustí biogenezi lysozomů (Zhitomirsky & Assaraf, 2015).

## 2 Teoretická část

### 2.1 Nádorová buňka

Rakovina je závažným zdravotním problémem celosvětové populace a je druhou nejčastější příčinou úmrtí v USA. V roce 2020 byla diagnostika a léčba rakoviny zpomalena pandemií COVID-19, což mohlo mít za následek chvilkové snížení incidence rakoviny ve světové populaci. Tento pokles však může být následován nárůstem výskytu pokročilých stádií rakoviny nebo může vyústit ve zvýšenou úmrtnost na nádorové onemocnění (Siegel, et al., 2021).

Celosvětově se v roce 2020 vyskytlo odhadem 19,3 milionu nových případů rakoviny a rovněž došlo k téměř 10 milionům úmrtí na tuto nemoc. Rakovina prsu u žen se stala oproti minulosti nejčastěji diagnostikovanou rakovinou. Odhadem se jedná o 2,3 milionu nových případů (11,7 %) této nemoci. Rakovina plic byla diagnostikována u 11,4 % pacientů, kolorektální karcinom u 10 %, karcinom prostaty u 7,3 % a rakovina žaludku 5,6 % pacientů s nádorovým onemocněním. Nejčastější příčinou úmrtí v důsledku nádorového onemocnění mohl být karcinom plic s odhadovanou úmrtností 18 % (1,8 milionu úmrtí), úmrtnost na kolorektální karcinom byla odhadem 9,4 % a úmrtnost na ženský karcinom prsu činila 6,9 % (Sung et al., 2021).

Rakovina je nemoc, která má původ v genetickém poškození buňky. Poškození může být vícero druhů, může se jednat o recesivní mutace tumor supresorových genů, dominantní mutace protoonkogenů, poškození může být způsobeno velkým přeskupením DNA, popřípadě může dojít k pouhé bodové mutaci, která zapříčiní genetické poškození buňky. Všechna tato poškození vedou k narušení exprese genů nebo k porušení funkce produktů exprese.

Prvotní myšlenka, že za rakovinu může genetické poškození, se opírala o různé důkazy, mezi něž patří rozpoznání dědičných predispozicí k rakovině, detekce poškozených chromozomů v rakovinných buňkách, zjevná souvislost mezi vznikem rakoviny a zhoršenou schopností buněk opravovat poškozenou DNA a také se tato myšlenka zakládala na důkazech, které poukazují na mutagenní potenciál látek vedoucí ke karcinogenitě (Bishop, 1988, 1991).

Nyní již dobře víme, že genetické abnormality jsou základem pro většinu rakovin - mutace mohou transformovat normální buňky na rakovinné tím, že je obohatí o nové vlastnosti. Nestabilita genomu a mutace vedou k charakteristickým znakům rakoviny (Novikov, 2020). Předpokládá se, že obrovská variabilita genotypu nádorových buněk je manifestací deseti základních změn v buněčné fyziologii, které dohromady spustí maligní růst.

Těmito esenciálními změnami jsou: genomová nestabilita, soběstačnost v růstových signálech, necitlivost vůči inhibici růstových signálů, únik před buněčnou smrtí, neomezený replikační potenciál, deregulace bioenergetiky buňky, indukce angioneogeneze, aktivace invaze do tkání s tvorbou metastáze, nádor-podporující zánět, vyhnutí se imunitnímu dohledu.

Každá z těchto fyziologických změn buňky je novou schopností získanou během vývoje nádoru. Tyto schopnosti umožňují úspěšné porušení obranného protinádorového mechanismu, který je pevně zakotven v každé buňce a tkáni a je zapojen do boje proti rakovinnému bujení (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

### **2.1.1 Genomová nestabilita**

Získání charakteristických znaků nádorové buňky závisí z velké části na řadě úspěšných změn v genomu neoplastických buněk. Lze říci, že určité mutantní genotypy poskytují selektivní výhodu subklonům buněk, což umožňuje jejich růst a případnou dominanci v prostředí tkáně, ve které se vyskytují. V souladu s tím je možné popsat vícekrokovou progresi nádoru jako posloupnost klonálních expanzí, z nichž každá je vyvolána náhodným získáním mutantního genotypu. Protože dědičný fenotyp, jako je inaktivace tumor supresorových genů, lze získat i pomocí epigenetických mechanismů, jako je metylace DNA a modifikace histonů, mohou být některé klonální expanze vyvolané nemutantními změnami ovlivňujícími regulaci genové exprese.

Systém pro udržování integrity genomu u normální buňky má schopnost detekovat a řešit defekty v DNA, což zajišťuje, že rychlosti výskytu spontánní mutace jsou během každé generace buněk obvykle velmi nízké. V průběhu získávání mutantních genů potřebných k řízení tumorigeneze rakovinné buňky se často zvyšuje počet mutací

a rychlost jejich výskytu. Těto proměnlivosti může být dosaženo zvýšenou citlivostí na mutagenní látky, rozpadem jedné nebo několika složek mechanismu udržování integrity genomu nebo kombinací obojího. Kromě toho lze akumulaci mutací urychlit narušením systému dozoru, který normálně monitoruje genomovou integritu a nutí geneticky poškozené buňky do senescence nebo apoptózy. Role genu TP53 je v systému dozoru nad genomovou integritou ústřední. Jeho funkce je natolik zásadní, že se mu říká „strážce genomu“.

Byla zdokumentována různorodá škála defektů ovlivňujících různé komponenty mechanismů údržby DNA. Tyto mechanismy se často označují jako „ošetřovatelé“ genomu. Seznam těchto defektních „ošetřovatelských“ genů zahrnuje ty, jejichž produkty se podílejí na detekci poškození DNA a aktivaci opravných mechanismů, přímé opravě poškozené DNA a inaktivaci nebo zachycení mutagenních molekul dříve, než DNA poškodí.

Z genetického hlediska se tyto „ošetřovatelské“ geny chovají podobně jako tumor supresorové geny, protože jejich funkce mohou být během progresu nádoru ztraceny, přičemž těchto ztrát lze dosáhnout buď inaktivujícími mutacemi nebo prostřednictvím epigenetické represe.

Důležitým ochráncem integrity genomu je i telomerasa. Ztráta telomerické DNA v mnoha nádorech generuje karyotypickou nestabilitu a rovněž generuje i související amplifikaci a delecii chromozomálních segmentů (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **2.1.2 Soběstačnost v růstových signálech**

Pravděpodobně nejzákladnější vlastností rakovinných buněk je jejich schopnost udržovat chronickou proliferaci. Normální tkáň pečlivě kontroluje produkci a uvolňování signálů podporujících růst buňky. Tyto signály nařizují postup buněčným cyklem, čímž zajišťují homeostázu počtu buněk a tím udržují normální architekturu a funkci tkáň (Hanahan & Weinberg, 2011). Normální, maligně nezměněné buňky, potřebují mitogenní růstové signály pro svůj přechod z klidového stádia do stádia aktivní proliferace. Tyto signály jsou přenášeny do buňky pomocí transmembránových receptorů (Aaronson, 1991).

Transmembránové receptory vážou charakteristické třídy signálních molekul jako jsou difúzní růstové faktory, extracelulární komponenty matrix a také „cell- to-cell“ adhezní a interakční molekuly. Pokud je známo, žádná normální buňka není schopna proliferace v případě, že jí chybí tyto stimulační růstové signály. Závislost na růstových signálech je patrná v případě, kdy se buňky nachází v in vitro kultuře. Buňky se dělí pouze tehdy, když mají k dispozici dostatečné množství mitogenů – faktorů podporujících mitózu a správný substrát pro své integriny.

Závislost normálních buněk na zevních růstových signálech je naprostým opakem toho, co pozorujeme u buněk nádorových. Závislost nádorových buněk na exogenních růstových signálech je silně potlačena, což má za následek to, že nádorové buňky vytváří mnoho vlastních růstových signálů, které snižují jejich závislost na stimulaci z okolního fyziologického mikroprostředí (Hanahan & Weinberg, 2000).

Rakovinné buňky získávají schopnost udržovat proliferativní signalizaci mnoha alternativními způsoby. Například mohou samy rakovinové buňky produkovat ligandy růstových faktorů, na které pak mohou reagovat prostřednictvím exprese příbuzných receptorů, což vede k autokrinní proliferativní stimulaci.

Dalším alternativním způsobem udržování aktivní proliferace je vysílání signálu rakovinovými buňkami ke stimulaci normálních buněk, kdy normální buňky reagují na tuto stimulaci zásobováním rakovinných buněk různými růstovými faktory. Receptorová signalizace může být také deregulována zvýšením hladin receptorových proteinů, které jsou vystaveny na povrchu rakovinných buněk, což způsobí, že tyto buňky budou hyperreaktivně reagovat na jinak omezující množství ligandu růstového faktoru. Stejně může nádorová buňka reagovat i v případě strukturální změny v molekulách receptoru (Hanahan & Weinberg, 2011).

Na neomezené proliferaci se podílí aktivace protoonkogenů na onkogeny. Protoonkogeny jsou pozměněné formy normálních buněčných genů. Obvykle se nacházejí v sousedství hraničních bodů chromozomů a jsou cílem mutací. Protoonkogeny jsou geny, které se účastní regulace, dělení a diferenciaci buněčného cyklu. K jejich aktivaci může dojít vložением bodových mutací do genu. Například protoonkogeny odvozené od rodiny c-ras mohou mít mutaci pouze v jedné bázi v poloze 12 nebo 61, což stačí k tomu, aby se staly onkogenem. Protookogeny lze také aktivovat na onkogeny inzercí retrovirových sekvencí blízko genu,

aniž by se změnila jeho kódující sekvence. Taková aktivace protoonkogenu probíhá u c-myc, c-erbB, c-mos, cH-ras a dalších.

Abnormálně aktivované protoonkogeny se stávají onkogeny. Onkogeny jsou geny, které přispívají k maligní transformaci buňky. Prvně byly objeveny v roce 1911, kdy byl identifikován virus Rousova sarkomu. Poznatek, že retrovirus může nést geny podporující vznik rakoviny, vedla k explozivnímu vývoji v této oblasti.

Onkogeny kódují proteiny, které přímo regulují regulační proteiny buněčného růstu a také mohou ovlivňovat stabilitu genomu. Deregulací regulačních proteinů dochází k nekontrolovanému dělení buněk, tvorbě nádorů a invazivnímu růstu. Některé produkty onkogenů působí mimo buňku, například růstové faktory. Příkladem genu růstového faktoru je c-sis, který se účastní B řetězce růstového faktoru odvozeného z krevních destiček (PDGF). Jiné produkty onkogenů působí na úrovni buněčné membrány. V cytoplazmě se mohou onkogeny (např. c-ras) účastnit signální transdukce. V jádře mohou onkogeny (např. c-jun) působit jako transkripční faktory a fosforylovat cílové proteiny. (Alvarez & Besa, 2000).

### 2.1.3 Necitlivost vůči inhibici růstových signálů

Uvnitř normální tkáně operují mnohé protiproliferační signály, které mají za úkol udržovat klidový stav buňky a homeostázu tkáně. Protiproliferační signály zahrnují rozpuštěné růstové inhibitory a imobilizované inhibitory, nacházející se v extracelulárním prostoru poblíž buňky nebo na samotném buněčném povrchu. Tyto signály jsou stejně jako jejich protějšky – růstové signály – přijímány do buňky pomocí transmembránových receptorů.

Transmembránové receptory jsou spojeny s intracelulárními signálními drahami. Spousta těchto drah, umožňujících normální buňce odpovídat na protirůstové signály, je úzce spjata s buněčným cyklem. Konkrétně se složkami řídicími průchod buňky G1 fází buněčného cyklu.

Buňky během této periody monitorují své okolí a na základě signálů, které dostávají, se rozhodují, zda-li se budou množit, zůstanou v klidovém stavu nebo stanou-li se postmitotickými (Hanahan & Weinberg, 2000).

Kromě charakteristického znaku vyvolávání a udržování pozitivně působících signálů stimulujících růst, musí rakovinné buňky také obcházet ochranné buněčné mechanismy, které negativně regulují buněčnou proliferaci. Mnoho z těchto buněčných mechanismů závisí na působení tumor supresorových genů. Prototypem tumor supresorového genu je gen RB1, kódující protein pRB a gen TP53 kódující protein p53. Protein pRB (retinoblastomový protein) a protein p53 fungují jako centrální řídicí uzly ve dvou klíčových celulárních regulačních obvodech, které řídí buněčnou proliferaci nebo alternativní aktivaci programů stárnutí a apoptózy.

Protein pRB integruje se signály z různých extracelulárních a intracelulárních zdrojů a v reakci na to rozhodne, zda by buňka měla pokračovat ve svém buněčném cyklu nebo nikoliv. Rakovinovým buňkám s defekty ve funkci dráhy RB tak chybí „služby kritického strážce“ progresu buněčného cyklu, jehož absence umožňuje trvalou buněčnou proliferaci. Zatímco pRB přenáší signály inhibující růst, jejichž původ je převážně extracelulární, p53 přijímá informace ze sensorů stresu a abnormalit, které fungují v intracelulárních operačních systémech buňky. Pokud je stupeň poškození genomu nadměrný nebo jsou-li neoptimální hladiny nukleotidových zásob, hladiny signálů podporujících růst, hladina glukózy nebo hladina okysličování,



může p53 zastavit další postup buněčného cyklu do doby, dokud nebudou tyto podmínky normalizovány.

Alternativně může p53 spustit apoptózu v případě, že buňka čelí výstražným signálům, které naznačují ohromné nebo nenapravitelné poškození těchto buněčných subsystémů (Hanahan & Weinberg, 2011). Mutace v tumor supresorových genech způsobují ztrátu funkce genu. Tyto genetické změny mění strukturní gen nebo působí tak, že vypnou regulační prvky bez syntetizovaného genového produktu (Stanley J. Korsmeyer, 1999) .

Na molekulární úrovni jsou nejspíše všechny protiproliferační signály přiváděny do buňky prostřednictvím pRb (Hanahan & Weinberg, 2000). Protein pRb je nejdůležitějším proteinem, který reguluje postup buněčného cyklu do S fáze. Fosforylace pRb způsobuje inaktivaci jeho inhibiční růstové funkce (Pai et al., 2000).

V hypofosforylovaném stavu blokuje pRb proliferaci sekvencí a změnou funkce transkripčních faktorů E2F, které kontrolují expresi genů nezbytných pro postup z G1 do S fáze (Weinberg, 1995). Narušení dráhy pRb uvolňuje transkripční faktory E2F, což umožňuje buněčnou proliferaci. Buňky se tak stávají necitlivé vůči protirůstovým faktorům, které normálně blokují postup buňky G1 fází buněčného cyklu.(Hanahan & Weinberg, 2000).

#### 2.1.4 Únik před programovanou buněčnou smrtí

Programovaná buněčná smrt – apoptóza – slouží jako přirozená bariéra proti rozvoji rakoviny. Studium apoptózy odhaluje, jakým mechanismem je spouštěna v návaznosti na buněčnou odpověď, která se odvíjí od získaných podnětů - různých druhů stresu (Hanahan & Weinberg, 2011).

Apoptóza zahrnuje sérii buněčných událostí, které vedou k aktivaci rodiny cysteinových proteas nazývaných kaspasy. V odpovědi na různé apoptotické stimuly je aktivována „iniciační“ kaspasa (casp-2, casp-8, casp-9 nebo casp-10). Iniciační kaspasy poté štěpí zymogenní formy „popravčích“ kaspas (casp-3 nebo casp-7), čímž je aktivují. Aktivované „popravčí“ kaspasy způsobují proteolytické štěpení specifických buněčných substrátů, což neodvratně vede k buněčné smrti (Fernald & Kurokawa, 2013).

Jakmile je apoptóza spuštěna, rozvíjí se v přesně na sebe navazujících krocích. Buněčné membrány jsou narušeny, cytoplasmatický a jaderný skelet je rozložen, cytosol je postupně odškrvcován v podobě apoptotických tělísek, chromozomy jsou degradovány a jádro je fragmentováno. Nakonec je pozůstatek mrtvé „scvrklé“ buňky pohlcen okolními buňkami v tkáni (Wyllie, Kerr, & Currie, 1980).

Apoptotický aparát může být rozdělen na dvě složky a to efektorovou a senzorickou. Senzory jsou odpovědné za monitorování vnitřního a vnějšího prostředí buňky a rozhodují, je-li prostředí pro buňku normální nebo abnormální a tím určují, zda-li buňka bude nadále žít nebo zemře. Signály zjištěné senzory regulují druhou složku apoptotického aparátu, která má funkci efektoru apoptotické smrti. Tyto hlídky mají receptory na buněčném povrchu, které váží faktory přežití nebo faktory smrti (Hanahan & Weinberg, 2000).

Intracelulární senzory monitorují buněčnou pohodu a aktivují dráhu smrti v případě, že senzory detekují abnormality zahrnující poškození DNA nebo nerovnováhu vyvolanou onkogenní akcí, popřípadě nerovnováhu způsobenou nedostatečností faktorů přežití. Dráha smrti se spouští i v případě detekce hypoxie (Evan & Littlewood, 1998).

Na rozdíl od normálních buněk jsou rakovinné buňky pod stálým stresem. Ten je vyvolán genomovou nestabilitou, buněčnou hypoxií a onkogenním stresem. V reakci na tyto podněty by se za normální situace aktivovala vnitřní cesta apoptózy.

Přes všechny tyto apoptózu vyvolávající stimuly se rakovinné buňky často dokáží vyhnout této buněčné reakci a to pomocí deaktivace apoptotických drah. Myší genetické modely ukázaly, že genetická inaktivace kaspasy může vést nejen k rezistenci na určité proapoptické podněty, ale může také urychlit tvorbu nádoru u myši. Inhibice apoptózy tedy hraje zásadní roli v přežití rakovinných buněk a v rozvoji nádoru (Fernald & Kurokawa, 2013).

V současné době je vnitřní apoptotický program vnímán jako bariéra proti rozvoji rakoviny. „Apoptotický spouštěč“, který přenáší signály mezi regulátory a efektory, je řízen vyvážením pro- a antiapoptotických členů rodiny regulačních proteinů Bcl-2. Bcl-2 spolu s nejvíce příbuznými proteiny (Bcl-xL, Bcl-w, aj.) jsou inhibitory apoptózy, které z velké části působí na dva proapoptotické spouštěcí proteiny (Bax a Bak). Když jsou Bax a Bak zbaveni inhibice antiapoptotickými příbuznými proteiny, narušují integritu vnější mitochondriální membrány a způsobují uvolňování proapoptotických signálních proteinů, z nichž nejdůležitější je cytochrom c.

Uvolněný cytochrom c aktivuje naopak kaskádu kaspas, které prostřednictvím svých proteolytických aktivit působí tak, že indukují mnohočetné buněčné změny spojené s apoptotickým programem.

Proteiny Bax a Bak sdílejí interakční domény protein-protein, nazývané motivy BH3, s antiapoptotickými proteiny podobnými Bcl-2, které zprostředkovávají jejich různé fyzické interakce. Aktivity podrodiny příbuzných proteinů, z nichž každý obsahuje jeden takový motiv BH3, jsou spojeny s řadou senzorů buněčné abnormality (Hanahan & Weinberg, 2011). Gen Bcl-2 byl identifikován v chromozomálním zlomovém bodě t(14;18) nesoucí lidský folikulární B buněčný lymfom. Ukázalo se, že Bcl-2 spíše blokuje programovanou buněčnou smrt, než podporuje proliferaci. Bcl-2 gen tak zahájil novou kategorii onkogenů - regulátorů buněčné smrti.

Členové rodiny proapoptických a antiapoptotických Bcl-2 představují ústřední regulátory v evolučně konzervované cestě buněčné smrti. Aberace v rodině Bcl-2 vedou k neuspořádané homeostáze a patogenitě vyvolávající nemoci včetně rakoviny. Potlačením normálních apoptotických drah pomocí Bcl-2 je buňkám, které udržují poškození DNA, umožněno vyhnout se apoptóze (Stanley J. Korsmeyer, 1999).

### 2.1.5 Neomezený replikační potenciál

Soběstačnost v růstových signálech, necitlivost vůči inhibici růstových signálů a únik před apoptózou vedou společně k odpojení od růstového plánu buňky, který je ovlivňován signály z prostředí. V zásadě by deregulovaná proliferace měla stačit k neomezenému růstu buněčné populace tvořící makroskopické nádory. Výzkum nicméně ukazuje, že tyto získané schopnosti narušení buněčné signalizace samy o sobě nezaručují expanzní růst národu.

Většina nebo možná všechny typy savčích buněk nesou vlastní buněčný autonomní program, který omezuje počet jejich dělení. Zdá se, že tento program funguje nezávisle na všech výše popsaných signálních drahách mezi buňkami. Aby došlo k nárůstu klonu buněk do velikosti, která představuje makroskopický, život ohrožující nádor, musí být narušen i onen autonomní program omezující počet dělení. Normální buňky v buněčné kultuře mají konečný replikační potenciál (Hanahan & Weinberg, 2000).

Jakmile taková buněčná populace projde určitým počtem dělení, populace přestane růst. Tento proces se nazývá senescence. Senescenci lze obejít deaktivací supresorových proteinů pRb a p53, což buňkám umožní pokračovat v replikaci, dokud se nedostanou do dalšího stavu, který je označován jako krize.

Krizový stav je charakterizován masivní smrtí buněk, karyotypickým zmatkem vzniklým fúzí chromozomů a občasným vznikem variantní buňky, která se může množit bez limitace, čímž získá schopnost imortalizace (Wright, Pereira-Smith, & Shay, 1989).

Mnoho důkazů naznačuje, že telomery chránící konce chromozomů jsou centrálně zapojeny do schopnosti neomezené proliferace. Telomery složené z několika opakování tandemových hexanukleotidů se progresivně zkracují u neimortalizovaných buněk, tedy u buněk fyziologických. Normální buňky propagované v kultuře nakonec ztrácejí schopnost chránit konce chromozomální DNA před „end-to-end“ fúzí. Takové fúze generují nestabilní dicentrické chromozomy, jejichž rozložení má za následek míchání karyotypu, což ohrožuje životaschopnost buněk. V souladu s tím určuje délka telomerické DNA, kolika po sobě následujícími generacemi může potomek původní buňky projít, než dojde k velké erozi telomer a následné ztrátě jejich ochranné funkce, což vyvolá vstup buňky do krize.

Telomerasa, specializovaná DNA polymerasa, která přidává segmenty telomer na konce telomerické DNA, téměř chybí v neimortalizovaných fyziologických buňkách. Naopak je zvýšeně exprimována na funkčně významných úrovních ve většině (90 %) spontánně imortalizovaných buněk, včetně lidských rakovinných buněk.

Prodlužováním telomerické DNA je telomerasa schopna čelit progresivní erozi telomer, která by se jinak vyskytovala v případě její nepřítomnosti. Přítomnost telomerasové aktivity ve spontánně imortalizovaných buňkách koreluje s rezistencí na indukci jak stárnutí, tak krize/apoptózy. Naopak potlačení aktivity telomerasy vede ke zkrácení telomer a k aktivaci jedné nebo druhé z těchto proliferativních bariér (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **2.1.6 Bioenergetika nádorové buňky**

Chronická a často nekontrolovaná buněčná proliferace, která představuje podstatu neoplastického onemocnění, zahrnuje nejen deregulovanou kontrolu buněčného dělení, ale také odpovídající úpravy energetického metabolismu s cílem podpořit růst a proliferaci buněk.

Za aerobních podmínek zpracovávají glukózu normální buňky nejprve glykolýzou na pyruvát v cytosolu a poté pyruvát na oxid uhličitý v mitochondriích. Za anaerobních podmínek je upřednostňována anaerobní glykolýza a do mitochondrií spotřebovávajících kyslík je odesíláno pyruvátu jen málo.

Otto Warburg poprvé pozoroval anomální charakteristiku energetického metabolismu rakovinných buněk. Dokonce i za přítomnosti kyslíku mohou rakovinné buňky přeprogramovat svůj metabolismus glukózy, čímž mohou ovlivnit produkci energie. Takové přeprogramování energetického metabolismu je zdánlivě nesmyslné, neboť rakovinné buňky musí kompenzovat 18krát nižší účinnost produkce ATP, kterou poskytuje anaerobní glykolýza ve srovnání s mitochondriální oxidativní fosforylací. Nádorové buňky kompenzují tuto nízkou účinnost produkce ATP částečně zvýšením regulace transportérů glukózy, zejména GLUT1, což podstatně zvyšuje import glukózy do cytoplazmy.

Ve skutečnosti bylo u mnoha typů nádorů zaznamenáno výrazné zvýšení absorpce glukózy. Dokonce bylo zaznamenáno i výrazné zvýšení jejího využití. Ukázalo se,

že glykolytické získávání energie je spojeno s aktivovanými onkogeny (např. RAS, MYC) a mutovanými tumor supresními geny (např. TP53). Tuto závislost na glykolýze lze ještě lépe pozorovat za hypoxických podmínek, které fungují v mnoha nádorech. Reakční systém nádoru na hypoxii působí pleiotropicky na upregulaci transportérů glukózy a na mnoho enzymů glykolytické dráhy. Ras onkoprotein i hypoxie tedy mohou nezávisle zvyšovat hladiny transkripčních faktorů HIF1 $\alpha$  a HIF2 $\alpha$ , které zase zvyšují regulaci glykolýzy. Vylepšená hypotéza objasňuje, že zvýšená glykolýza umožňuje odklon glykolytických meziproduktů do různých biosyntetických drah, včetně těch, které generují nukleosidy a aminokyseliny. To usnadňuje biosyntézu makromolekul a organel potřebných pro sestavování nových buněk (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **2.1.7 Angiogeneze**

Kyslík a živiny dodávané cévami mají zásadní význam pro funkci a přežití buněk. Prakticky všechny buňky ve tkáni musí být umístěny do vzdálenosti 100  $\mu\text{m}$  od krevní kapiláry. Během organogeneze je tato vzdálenost kapilár od buněk zajištěna koordinovaným růstem cév. Jakmile se vytvoří tkáň, je růst nových krevních cév - proces angiogeneze - přechodný a pečlivě regulovaný.

Kvůli závislosti na blízkých kapilárách se zdá pravděpodobné, že proliferující buňky v tkáni budou mít vlastní schopnost podporovat růst krevních cév. Ukazuje se ale, že buňky v aberantních proliferativních lézích zpočátku angiogenní schopnost postrádají, což omezuje jejich možnost expanze. Aby bylo dosaženo větší velikosti, musí se u začínajících neoplazií rozvinout angiogenní schopnost (Hanahan & Weinberg, 2000). Růst nádoru závisí na angiogenezi vyvolanou chemickými signály nádorových buněk ve fázi rychlého růstu. Rakovinné buňky bez napojení na krevní oběh mohou dorůst do velikosti 1-2  $\text{mm}^3$  v průměru a poté je jejich růst zastaven. V případě, že se nádor nenapojí na krevní oběh, může se stát nádor nekrotickým nebo dokonce i apoptotickým. Proto je angiogeneze důležitým faktorem při rozvoji rakoviny.

Angiogeneze je stimulována ve chvíli, kdy nádorová tkáň vyžaduje kyslík a živiny. Neovaskularizace, včetně angiogeneze nádoru, je v podstatě čtyřstupňový proces.

Nejprve je lokálně poraněna bazální membrána v tkáních, kdy okamžitě dochází k hypoxii. Druhým krokem je aktivace endotelové buňky angiogenními migrujícími faktory. Třetím krokem je množení a stabilizace endotelových buněk a posledním, čtvrtým krokem je ovlivnění angiogenního procesu pomocí angiogenních faktorů (Nishida et al., 2006).

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) je podstatným mediátorem angiogeneze. U zdravých lidí VEGF podporuje růst cév v embryonálním vývoji a je důležitý při hojení ran u dospělých. VEGF je klíčovým faktorem vyvolávajícím angiogenezi u rakoviny, ve které je up-regulován expresí onkogenu, řadou růstových faktorů a také hypoxií. Produkce VEGF a dalších růstových faktorů nádorem vede k „angiogennímu přepnutí“, kdy se v nádoru a jeho okolí vytvoří nová vaskulatura, která mu umožní exponenciálně růst. Vaskulatura tumoru vytvořená pod vlivem VEGF je strukturálně a funkčně abnormální - krevní cévy jsou nepravidelného tvaru. Cévy jsou klikaté, mají slepé uličky a nejsou organizovány do žil, arteriol a kapilár. Jsou rovněž děravé a hemoragické, což vede k vysokému intersticiálnímu tlaku. Všechny tyto vlastnosti mají za následek to, že tok krve do nádoru prostřednictvím těchto cév je neoptimální, což vede k hypoxii a další produkci VEGF (Carmeliet, 2005).

### **2.1.8 Metastáze**

Metastáze, šíření maligních buněk z primárního nádoru do vzdálených míst, představuje největší problém léčby rakoviny a je hlavní příčinou úmrtí pacientů s rakovinou. K tvorbě metastáz dochází v sérii oddělených kroků, které byly seřazeny do „metastatické kaskády“.

Klasický pohled na metastatickou kaskádu, počínaje od primární, epiteliální, neoplastické léze zahrnuje: (1) EMT (epiteliální-mezenchymální přechod) a porušení bariéry bazální membrány, (2) oddělení nádorových buněk z primárního nádoru, (3) invazi do sousední tkáně, (4) intravazaci do již existujících a nově vytvořených krevních a lymfatických cév, (5) transport přes cévy, (6) extravazaci z cév, (7) ustálení oddělených buněk (které mohou zůstat delší dobu nečinné) na sekundárním anatomickém místě, (8) růst mikrometastázy a makrometastázy/sekundárního nádoru. Každý krok je tvořen jednou nebo více fyziologickými bariérami proti šíření maligních buněk. Aby nádorová buňka mohla úspěšně metastázovat, musí všechny tyto bariéry zdolat (Geiger & Peeper, 2009).

### **2.1.9 Nádor-podporující zánět**

Některé nádory jsou hustě infiltrovány buňkami vrozeného i adaptivního imunitního systému, čímž zrcadlí zánětlivé stavy vznikající v nenádorových tkáních. S příchodem lepších markerů pro přesnou identifikaci odlišných typů buněk imunitního systému bylo zjištěno, že prakticky každá neoplastická léze obsahuje imunitní buňky přítomné v hustotách od jemných infiltrací detekovatelných pouze pomocí protilátek specifických pro daný buněčný typ až po záněty detekovatelné standardními technikami histochemického barvení.

Historicky se předpokládalo, že takovéto imunitní odpovědi odrážejí pokus imunitního systému o vymýcení nádorů. Již v roce 2000 však existovaly náznaky, které poukazovaly na to, že zánětlivá reakce spojená s nádorem měla neočekávaný paradoxní účinek na zvýšení tumorigeneze a progresu nádoru.

Zánět může přispět k mnoha charakteristickým vlastnostem nádoru tím, že dodá do mikroprostředí nádoru bioaktivní molekuly, včetně růstových faktorů udržujících



proliferativní signalizaci, faktorů přežití omezujících buněčnou smrt, proangiogenních faktorů, enzymů modifikujících extracelulární matrix usnadňujících angiogenezi, invazi a metastázy a indukčních signálů, které vedou k aktivaci EMT a dalších programů patřících k znakům rakoviny.

Zánět je v některých případech zjevný v nejranějších stádiích neoplastické progresi a je prokazatelně schopen podporovat rozvoj počínajících neoplazií až do plnohodnotné rakoviny. Kromě toho mohou zánětlivé buňky uvolňovat chemikálie, zejména reaktivní formy kyslíku, které jsou mutagenní pro blízké rakovinové buňky, což urychluje jejich genetický vývoj směrem ke stavům zvýšené malignity (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **2.1.1 Únik před imunologickým dohledem**

Dosud nevyřešeným problémem kolem tvorby nádorů je otázka, jakou hraje roli imunitní systém během tvorby a progresi počínajících neoplazií, nádorů v pozdním stadiu a mikrometastáz. Dlouhodobá teorie týkající se imunitního dozoru předpokládá, že buňky a tkáně jsou neustále monitorovány bdělým imunitním systémem a že takový imunitní dohled je zodpovědný za rozpoznání a eliminaci drtivé většiny počínajících rakovinných buněk, a tedy vznikajících nádorů. Podle této logiky se nádory, které se objeví, nějak dokázaly vyhnout detekci imunitním systémem nebo dokázaly omezit rozsah imunologického usmrcování, čímž se vyhnuly eradikaci. V posledních letech stále více důkazů naznačuje, že imunitní systém funguje jako významná bariéra pro tvorbu a progresi nádoru.

Diskuse o rakovinové imunologii zjednodušují imunologické interakce mezi nádorem a hostitelem, protože vysoce imunogenní rakovinné buňky se mohou dobře vyhnout imunitní destrukci deaktivací složek imunitního systému, které byly vyslány k jejich eliminaci. Rakovinné buňky mohou paralyzovat infiltrující cytotoxické lymfocyty a NK buňky vylučováním TGF- $\beta$  nebo vylučováním jiných imunosupresivních faktorů. Drobnější mechanismy fungují prostřednictvím nábory zánětlivých buněk, které jsou aktivně imunosupresivní, včetně regulačních T buněk (Tregs) a myeloidních supresorových buněk (MDSC). Jak Tregs, tak MDSC mohou potlačit působení cytotoxických lymfocytů (Hanahan & Weinberg, 2011).

## 2.2 Možnosti léčby nádorového onemocnění

Mezi příklady léčby rakoviny z počátku 19. století patří radikální, super-radikální a ultra-radikální chirurgie, jak ji propagoval William S Halstedt. Zejména radikální mastektomie byla používána k léčbě rakoviny prsu po dobu 90 let, a to mezi lety 1891 a 1981. V roce 1981 však Bernhard Fisher zveřejnil studii, která vyvrátila radikální chirurgický zákrok jako jediný způsob léčby rakoviny. Použití radikální chirurgie bylo okamžitě sníženo poté, co se potvrdilo, že systémová adjuvantní léčba v kombinaci s lokální chirurgií přinesla podobné, ne-li lepší výsledky. V dnešní době je rakovina léčena třemi hlavními přístupy a to radioterapií, imunoterapií a chemoterapií (Schirmacher, 2019).

Po objevu rentgenových paprsků v roce 1895 Wilhelmem Conradem Röntgenem byla poprvé oceněna jejich klinická užitečnost. Rentgenové paprsky byly použity jako prostředek léčby rakoviny (Baskar et al., 2012). Radioterapie je základním způsobem léčby rakoviny a přispívá k její léčbě nebo alespoň zmírňuje průběh nemoci u mnoha pacientů s nádorovým onemocněním (Delaney et al., 2005).

I přes to, že v posledních letech došlo k lepšímu pochopení charakteristik vývoje rakoviny a její léčby zůstává radiační terapie důležitou součástí léčby rakoviny, přičemž přibližně 50 % všech pacientů s rakovinou tuto metodu terapie v průběhu onemocnění využívá. Radioterapie přispívá k 40 % kurativní léčby rakoviny. Hlavním cílem radiační terapie je zbavit rakovinné buňky jejich multiplikačního potenciálu (Baskar et al., 2012).

Alternativním způsobem léčby rakoviny je imunoterapie. Imunoterapie se během posledních desetiletí významně rozvinula a doplňuje možnosti terapie. Na rozdíl od ostatních terapeutických konceptů je imunoterapie primárně zaměřena na prevenci metastatického šíření nemoci a na zlepšení kvality života nádorových pacientů. Přístupy, které se používají v imunoterapii, jsou založeny na komplementaci nebo stimulaci imunitního systému prostřednictvím velkého množství sloučenin, jako jsou lymfokiny, vakcíny, in vitro stimulované efektorové buňky imunitního systému nebo protilátky.

Kvůli své genetické nestabilitě nádorové buňky obvykle exprimují abnormální proteiny, tj. antigeny spojené s nádorem (TAA), které nejsou (nebo jen velmi omezeně)

exprimovány normálními buňkami. Takové TAA vystavují nové, potenciálně imunogenní epitopy, které lze rozpoznat imunitním systémem hostitele. Imunoterapie je určena k obnovení reaktivity imunitního systému hostitele v boji proti rakovině (Schuster, Nechansky, & Kircheis, 2006).

Hlavním způsobem léčby rakoviny je chemoterapie, což je standardní typ léčby rakoviny. Jedním z prvních chemoterapeutik objevených na konci 70. let byla cisplatina. Vyvolávala však závažné vedlejší účinky, jako například zvracení, které se opakovalo i 12× denně. Z důvodu absence antiemetik v té době, se přepokládalo se, že pacienti začnou nežádoucí vedlejší účinky agresivní chemoterapie tolerovat, k čemuž ovšem nedošlo.

Chemoterapie je účinná při léčbě různých typů lymfomů, ale u jiných typů rakoviny chemoterapie často nemá velké léčebné účinky. Může ovšem prodloužit celkové přežití pacienta. Chemoterapie se často podává hlavně jako paliativní léčba.

Přes veškerý pokrok je léčba chemoterapeutiky ztěžována a může se stát dokonce i neúčinnou v důsledku mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk.

## 2.3 Mnohočetná léková rezistence

Mnohočetná léková rezistence, zkráceně MDR, je schopnost nádorů vykazovat simultánní rezistenci vůči řadě strukturně a funkčně nesouvisejících chemoterapeutik. Je to získaná rezistence v průběhu léčby, kdy se původně citlivé nádorové buňky stanou necitlivé vůči cytostatickým a cytotoxickým účinkům použitých protinádorových léčiv. Nádorová buňka je tedy rezistentní nejen vůči již použitému léčivu, její rezistence zahrnuje i léčiva, se kterými buňka doposud nepřišla do kontaktu (Gottesman, Fojo, & Bates, 2002).

Termín mnohočetná léková rezistence (MDR) se používá k definování fenotypu rezistence, kdy jsou buňky rezistentní vůči více lékům bez zjevné strukturní podobnosti a s různými molekulárními cíli. Už je jasné, že je mnohočetná léková rezistence vždy multifaktoriální (Larsen, Escargueil, & Skladanowski, 2000).

Rezistence může být buď vnitřní (primární), kdy je nádorová buňka od samého počátku rezistentní vůči určitému cytostatiku (určitým cytostatikům), nebo získaná (sekundární), která se vyvíjí během léčby.

Je známo, že mnoho faktorů ovlivňuje vývoj sekundární rezistence. Mezi tyto faktory patří genetické změny rakovinných buněk, rychlost růstu nádoru a účinky mikroprostředí např. hypoxie, o které je dobře známo, že indukuje chemo- i radio-rezistenci (Merlos Rodrigo et al., 2020). Rezistence nádorových buněk vůči protinádorovým léčivům zůstává hlavní příčinou selhání léčby u pacientů s rakovinou (Larsen et al., 2000).

Bylo zjištěno, že mechanismů získané mnohočetné lékové rezistence je celá řada a mezi nejlépe prozkoumané mechanismy patří následující: (1) mutace molekulárního cíle léčiva, (2) deregulace mechanismů buněčné smrti (3) zvýšený odtok léčiva z rakovinných buněk (4) změny v aktivačních a/nebo detoxikačních enzymech, (5) alterace buněčného cyklu a změněná reparace (6) změny metabolismu a vylučování léčiva a nedostatečný přístup léčiva k nádoru, včetně hematoencefalické bariéry v nádorech mozku (7) snížený přístup léčiva k cílovým buněčným kompartmentům (lyzozomální sekvestrace) (Hraběta et al., 2020).

Mnoho z těchto mechanismů rezistence se neomezuje pouze na nádorové buňky, můžou se také objevit v bakteriích, kvasinkách, plísních nebo parazitech, což představuje hlavní výzvu pro budoucí chemoterapeutika.

Intracelulární distribuce léčiva je modifikována v mnoha MDR buněčných liniích, což vede ke zvýšené sekvestraci (jinak též akumulaci) léčiva v kyselých vezikulách, jako jsou recyklované endozomy, lysozomy, nebo trans-Golgiho aparát. Vzhledem k tomu, že většina protinádorových agens cílí na DNA nebo na jaderné enzymy, vede sekvestrace léčiva v cytoplazmatických organelách ke snížení interakce lék-cíl a tím dochází ke snížení cytotoxicity léku. Změněná intracelulární distribuce léčiva je obvykle spojena s expresí efluxních pump léků, jako je P-glykoprotein a multidrug rezistence protein (MRP1). Další běžnou modifikací v MDR buňkách je alkalizace intracelulárního pH. Mnoho experimentálních studií i klinické praxe ukazují, že rezistence rakovinových buněk je způsobena kombinací vícero mechanismů a překonání problému MDR bude vyžadovat komplexní přístup (Larsen et al., 2000).

Existují dvě obecné třídy rezistence vůči protinádorovým léčivům. První třída zahrnuje rezistence, které zhoršují příjem antitumorových látek nádorovými buňkami, druhá třída obsahuje rezistence, které vznikají v samotné rakovinové buňce v důsledku genetických a epigenetických změn, které ovlivňují citlivost buňky na léčivo. Zhoršený příjem léčiva může být důsledkem špatné absorpce perorálně podávaných léčiv, zvýšeného metabolismu léčiva nebo zvýšeného vylučování, což má za následek nižší hladiny léčiva v krvi a sníženou difúzi léčiva z krve do nádoru. Rakovinové buňky v kultuře se mohou stát rezistentními vůči jednomu léčivu nebo vůči třídě léčiv s podobným mechanismem účinku. K rezistenci dochází změnou buněčného cíle léčiva nebo zvýšením opravy poškození buňky vyvolanou léčivem (Gottesman et al., 2002). Některé z mechanismů lékové rezistence jsou popsány v následujícím textu.

### 2.3.1 Mutace molekulárního cíle léčiva

Jeden z nejvýznamnějších a nejběžnějších mechanismů rezistence na cílenou terapii je spojen se změnami (například mutací) v molekulárním cíli léčiva, což vede ke snížení kompetence použitého chemoterapeutika - inhibitoru. Klasickým příkladem inhibitoru je imatinib (STI). Přestože STI vykazuje významný klinický přínos pro pacienty s chronickou myeloidní leukémií s pozitivními BCR-ABL, odpověď na léčbu je u některých pacientů jen krátkodobá. V mnoha případech je to způsobeno mutacemi v BCR-ABL, které narušují interakci imatinibu s kinázovou kapsou, což vede k rezistenci. Vícečetné bodové mutace nebo mutace způsobené posunem čtecího rámce v BCR-ABL byly spojeny s rezistencí na imatinib a představují alespoň 50 % případů rezistence na tuto sloučeninu.

Objev těchto mechanismů rezistence umožnil vývoj inhibitorů BCR-ABL druhé generace (např. dasatinib, nilotinib) a třetí generace (např. ponatinib, bosutinib), které mohou vázat většinu mutovaných forem BCR-ABL, což má terapeutický přínos pro pacienty s mutacemi BCR-ABL rezistentními na imatinib. Tento příklad poukazuje na důležitost včasné identifikace mechanismu adaptace nádoru na používanou terapii. Při včasné odhalení mechanismu rezistence se může zamezit růstu a šíření nádorů pomocí nové terapie založené na poznatcích o mechanismech rezistence na terapii stávající.

Rezistence na inhibitory EGFR, FLT3 (fms like tyrosine kinase 3), FGFR (receptor růstového fibroblastového faktoru), SRC (protoonkogen Sarcoma genu) nebo MEK1 (mitogenem aktivovaná proteinkinasa 1) jsou další příklady rezistence způsobené mutací molekulárního cíle (Ramos & Bentires-Alj, 2015).

### 2.3.2 Změna regulace apoptózy

Protinádorová léčiva typicky indukují programovanou buněčnou smrt nebo apoptózu. Rozhodnutí, zda buňka bude pokračovat ve svém buněčném cyklu nebo jestli podstoupí apoptózu závisí na komplexní souhře genů a proteinů, které mají regulační roli v buněčných dějích. Předpokládá se, že tumor supresorový gen p53, je klíčový nejen pro indukci zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a pro indukci apoptózy po poškození DNA způsobeném protinádorovými léky, ale že je důležitý také v regulaci exprese downstreamových proteinů, Bcl-2 a bax (Krishna & Mayer, 2000; Lowe et al., 1993). Rezistence se proto může vyvinout při ztrátě genů nezbytných pro buněčnou smrt, jako je TP53 nebo při nadměrné expresi genů, které blokují buněčnou smrt.

B-buněčný lymfom-2 (Bcl-2) je gen, který hraje klíčovou roli v regulaci cest buněčné smrti. Bcl-2 slouží k ochraně buňky před podněty (např. UV nebo gama záření, aj.) způsobujícími buněčnou smrt. Bylo také zjištěno, že Bcl-2 je nadměrně exprimován u pacientů s AML a CLL. Bcl-2 může propůjčit buněčnou odolnost vůči cytotoxickým účinkům řady protirakovinných činidel (např. mitoxantronu a cisplatiny).

Na rozdíl od P-GP zprostředkované MDR, nadměrná exprese Bcl-2 nezabrání přílivu léčiva do nádorových buněk. Ukázalo se, že když je Bcl-2 nadměrně exprimován a zároveň se účastní rezistence, tak protirakovinné léky podporují zastavení buněčného cyklu. Účinky léků jsou však v tomto případě spíše cytostatické než cytotoxické. Výsledky in vitro prokázaly, že buněčné linie postrádající p53 vykazují zvýšenou odolnost proti indukci apoptózy protirakovinnými léky nebo radiací (Krishna & Mayer, 2000).

### 2.3.3 Zvýšený odtok léčiva - lékové transportéry

Rezistence zprostředkovaná lékovými transportéry obecně vyplývá z exprese efluxních pump závislých na ATP se širokou specificitou pro léčiva. Tyto efluxní pumpy patří do rodiny ATP binding cassette (ABC) transportérů. Rezistence způsobená lékovými transportéry spočívá v tom, že zvýšený eflux léčiva snižuje intracelulární koncentrace léčiva. Mezi léky, které jsou ovlivněny klasickou MDR, patří např. vinca alkaloidy vinblastin a vinkristin. Rezistence může být také zprostředkována sníženým příjmem léků. Selektce rakovinných buněk v kultuře s protinádorovými léčivy z přírodních produktů (např. paklitaxel), často vede k mnohočetné lékové rezistenci, která je způsobena expresí transportéru ABC P-GP, produktu genu ABCB1 (nebo MDR1).

Efluxní pumpa P-GP funguje jako transportér pro široké spektrum léčiv. P-GP účinně odstraňuje cytotoxické léky a mnoho běžně používaných léčiv z lipidové dvojvrstvy. Jelikož ne všechny multirezistentní buňky exprimují P-GP, bylo zahájeno hledání dalších efluxních pump, což vedlo k objevu proteinu MRP1.

MRP1 je strukturou podobný P-GP, rozpoznává a transportuje neutrální i aniontové hydrofobní přírodní látky a také glutation (Gottesman et al., 2002). Tyto dvě pumpy (P-GP a MRP1) představují dobře charakterizované mechanismy MDR (Krishna & Mayer, 2000). Po objevu MRP1 bylo objeveno několik dalších členů podskupiny transportérů ABC s možnou schopností zprostředkovat rezistenci (Gottesman et al., 2002).



### 2.3.4 Narušení DNA reparačních mechanismů

Reparace DNA je děj, při kterém buňka identifikuje a koriguje poškození molekul DNA, které je indukováno např. endogenními ROS, ultrafialovým zářením, toxiny z rostlin, mutagenními chemikáliemi nebo chemoterapeutickými činidly. Existuje několik typů DNA reparací, mezi něž patří excizní opravy (excizní oprava nukleotidu a excizní oprava báze) a mismatch reparace.

Excizní opravy mohou být příčinou rezistence vůči lékům, jejichž terapeutickým cílem je DNA. Na excizní opravě nukleotidů se podílí enzymový komplex ERCC1-XPF, který je tvořen z proteinu ERCC1. Studie ukázaly, že enzymový komplex ERCC1-XPF by mohl opravovat poškození DNA indukované léčivy, jejichž terapeutický cíl je právě DNA. Některá léčiva, jako třeba cisplatina, mohou indukovat nadměrnou expresi ERCC1 a tím může být vyvolána chemorezistence (Zheng, 2017).

Mismatch reparace (MMR) je vysoce konzervovaná, vláknově specifická oprava, která se spouští postupným procesem zahájeným rozpoznáváním poškození DNA. Proteiny MMR, nazývané Mut proteiny, rozpoznávají chyby v párování bází v DNA a iniciují vyříznutí postižené oblasti. Po vyříznutí je znovu nasyntetizována chybějící oblast DNA. Když dojde v genu pro MMR k mutaci, popřípadě je snížena jeho exprese, není MMR mechanismus schopný napravit poškození DNA, což může vést až k mikrosatelitní nestabilitě. Defekty MMR mohou být dědičné, jako v případě dědičného nepolypózního kolorektálního karcinomu. Nefunkčnost MMR může také nastat epigenetickým umlčením esenciálního genu MMR. K epigenetickému umlčení MMR dochází nejčastěji hypermethyloací promotoru Mut L homologue 1 (hMLH1), což bylo prokázáno u karcinomu vaječníků, endometria, žaludku a kolorekta.

Pro detekci poškozené DNA je zapotřebí funkční systém MMR. Některá léčiva (např. na bázi platiny) narušují normální aktivitu MMR a brání dokončení opravy. Neschopnost dokončit opravu poškozené DNA vede k apoptóze. V případě, že je MMR deficitní, buňky mohou pokračovat v proliferaci i přes poškození DNA a mohou se tak stát rezistentními (L. P. Martin, Hamilton, & Schilder, 2008).

### **2.3.5 Buněčná léková rezistence – lysozomální sekvestrace**

V poslední době se diskutuje mechanismus MDR mediovaný lysozomální sekvestrací. Bylo prokázáno, že lysozomy sekvestrují lipofilní, slabě bazická chemoterapeutická léčiva prostřednictvím neenzymatického mechanismu. Rovněž bylo pozorováno, že adriamycin, který je slabou hydrofobní bází, se koncentruje v lysozomech buněk rezistentních na léčivo, ale ne v lysozomech buněk na léčivo citlivých. Tyto slabé hydrofobní báze jsou pravděpodobně díky svému hydrofobnímu složení volně transportovány do lysozomů pasivním transportem.

Podobně může být intracelulární účinnost těchto sloučenin snížena in vitro při kyselém pH. Mnoho léků používaných k léčbě malignit má povahu slabých zásad a v několika studiích bylo prokázáno, že jsou v lysozomech akumulovány. Výsledky studií naznačují, že lysozomy fungují jako rezervoár, který „vysává“ léčivo z cílového místa účinku (Halaby, 2019).

## 2.4 Lysozomy

Lysozomy jsou buněčné organely, které byly poprvé biochemicky rozpoznány v játrech potkanů jako struktury připomínající váčky. (De Duve, Pressman, Gianetto, Wattiaux, & Appelmans, 1955). Přibližně před půl stoletím byla ještě v učebnicích biologie popisována živočišná buňka jako útvar složený z jádra, membrány a něčeho mezi tím, což bylo nazváno protoplasma. Během následujících let ovšem proběhla revoluce v buněčné biologii a to díky vědcům, kteří se rozhodli podívat se na buňku pod nově se vyvíjejícím přístrojem – elektronovým mikroskopem.

Díky elektronové mikroskopii a frakcionaci vysokorychlostní centrifugací spojenou s biochemickou analýzou byla postupně objevena struktura protoplasmy. Zjistilo se, že se v protoplasmě nachází nejrůznější subcelulární struktury mající své specifické funkce, které jsou pro buňku esenciální (Bowers, 1998).

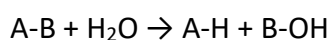
Jedním z důležitých objevitelů těchto struktur byl belgický biochemik a cytolog Christian René Marie Joseph de Duve. Christian de Duve se svými spolupracovníky z laboratoře v Luvani objevili lysozomy v letech 1955 a roku 2006 definoval de Duve i peroxisomy. Byl posledním ze skupiny významných fyziologických chemiků, kteří ve 40. a 50. letech začali zkoumat ony subcelulární struktury a organizaci biochemických drah, čímž předurčili vznik moderní buněčné biologie. Christian DeDuve, Albert Claude a George Palade obdrželi Nobelovu cenu v roce 1974 „za objevy týkající se strukturální a funkční organizace buňky“ (Sabatini & Adesnik, 2013).

### 2.4.1 Vlastnosti a funkce lysozomů

Všechny eukaryotické buňky obsahují lysozomy, avšak jejich morfologie, velikost a počet jsou různé, v závislosti na typu buňky a jejím funkčním stavu. Lysozomy mají průměr okolo 0,1 - 2 $\mu$ m a jsou odpovědné za degradaci endogenních makromolekul (Kornfeld & Mellman, 1989). Lysozomy jsou tvořeny membránou, která obklopuje vnitřní prostředí organely, které obsahuje různé kyselé hydrolasy (De Duve & Wattiaux, 1966). Membrána lysozomů je tvořena jednou fosfolipidovou dvouvrstvou. Uvnitř lysozomu se nachází řada trávicích enzymů aktivních v prostředí kyselého pH. Kyselé vnitřní prostředí lysozomů bohaté na hydrolasy je schopné degradovat většinu biologických makromolekul. Těchto kyselých hydrolas je v lysozomu kolem padesáti včetně různých fosfatas, nukleas, glykosidas, proteas, peptidas, sulfatas i lipas (Bainton, 1981). Lysozomálním hydrolasám byla až do objevu ubikvitin-proteazomového systému přikládána odpovědnost za hlavní část proteinového obratu. Nyní už je dobře známo, že endozomální/lysozomální systém má spoustu dalších funkcí, včetně funkce přežití (Turk & Turk, 2009).

V důsledku kyselého vnitřního prostředí jsou endogenní součásti lysozomu neustále nahrazovány nově syntetizovanými komponenty. Kromě toho musí být dělicí se buňky schopné tvořit lysozomy nové (Kornfeld & Mellman, 1989).

Nedávno bylo zjištěno, že lysozomy a lysozomální proteasy se účastní cest buněčné smrti. Účast lysozomů při apoptóze je pro buňky fatální (Turk & Turk, 2009). Lysozomální enzymy jsou schopny hydrolyzovat téměř všechny třídy makromolekul podle následujícího schématu.



Produkty rozpadu jsou obvykle k dispozici pro opětovné využití metabolismem. Funkčně se zdá, že lysozomy slouží jako „továrna na recyklaci a úklid“ všeho, co může být využito. Někdy lysozom akumuluje i nestravitelné zbytky, které buňka neumí využít. Občas se stane, že jsou tyto zbytky v lysozomu uloženy do konce života buňky (Bainton, 1981).

## 2.4.2 Biogeneze lysozomů

Otázka, jak jsou lysozomy tvořeny, zajímala buněčné biology po desetiletí. Rané mikroskopické studie naznačovaly, že lysozomy se tvoří přímým pučením z Golgiho komplexu (Mullins & Bonifacino, 2001). Později byl vytvořen model, který předpokládá, že lysozomy maturují z endozomálního kompartmentu. Tento model maturace zahrnuje formaci z brzkého endozomu koalescencí vezikul z plazmatické membrány (Murphy, 1991). Odstranění recyklačních vezikul a přidání vezikul odvozených od trans-Golgiho sítě (TGN) převádí tyto endozomy na pozdní endozomy a nakonec na lysozomy.

Alternativní model vezikulárního transportu předpokládá, že brzké endozomy, pozdní endozomy a lysozomy jsou stabilní kompartmenty. Probíhá transport z brzkého endozomu, přes endozomální přenosový vezikul s charakteristickým multivezikulárním tělískem, do pozdního endozomu, který maturuje v lysozom (Mullins & Bonifacino, 2001). Scénáře popisující interakci mezi pozdním endozomem a lysozomem zahrnují model „polibku a útěku“. Tento model předpokládá, že endozomy a lysozomy podstupují opakující se cykly fúze a štěpení umožňující nejen přenos materiálu, ale i údržbu zralého lysozomu (Storrie & Desjardins, 1996). Navržené varianty modelu předpokládají heterotypickou fúzi pozdního endozomu s lysozomem za vzniku hybridní organely s následnou lysozomální reformací. Nejen, že se modely vzájemně nevyklučují, ale je navíc i možné, že se v buňce uplatňuje více než jeden mechanismus lysozomální biogeneze. Fakt, že existuje takové množství modelů pro tvorbu lysozomu, akorát ukazuje, jak málo je prozatím pochopen tento děj (Mullins & Bonifacino, 2001).

Lysozomální biogeneze je regulována koordinovanou genovou sítí lysozomální exprese a regulace (CLEAR), která je aktivována hlavními regulátory po jejich translokaci do jádra, mezi hlavní regulátory patří E basic helix – loop – helix protein 35 (transkripční faktor EB, TFEB), transkripční faktor E3 (TFE3) a mitochondriální translační iniciační faktory (MTIF). Síť CLEAR řídí expresi lysozomálních enzymů potřebných pro štěpení biomolekul a genů spojených s hlavními cestami přenosu, včetně autofagie, endo/exocytózy a fagocytózy. Činnosti mTOR1 a lysozomů jsou propojeny, protože mTOR1 reguluje mimo jiné expresi V-ATPasy. Tato regulace je způsobena fosforylací TFEB a její jadernou translokací, která je řízena mTOR1 (Palmieri et al., 2011; Peña-Llopis et al., 2011).

### 2.4.3 Lysozomální proteiny

Lysozomální proteiny jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu a jsou přenášeny sekreční cestou do endolysozomálního systému. Bylo charakterizováno několik receptorů, které provádějí post-Golgiho transport těchto proteinů. Některé z receptorů rozpoznávají své nákladové proteiny na základě specifických aminokyselin, jiné na základě konkrétní glykanové modifikace, která se nachází výlučně na lysozomálních proteinech.

Téměř všechny receptory sloužící k biogenezi lysozomů jsou pod transkripční kontrolou transkripčního faktoru EB (TFEB), hlavního regulátoru lysozomálního systému. TFEB koordinuje expresi lysozomálních hydrolas, lysozomálních membránových proteinů a autofagických proteinů v reakci na dráhy snímající lysozomální stres a nutriční podmínky buňky, tyto dráhy snímají ovšem i jiné podněty (Bajaj et al., 2019).

Lysozomy jsou zodpovědné za degradaci makromolekul jak z extracelulárního prostoru, tak i intracelulárního prostoru, které se do lysozomu dostaly prostřednictvím endocytózy nebo fagocytózy. Makromolekuly z cytoplazmy jsou do lysozomu dopravovány autofagií. Proteinové složky lysozomální membrány zprostředkovávají řadu základních funkcí tohoto kompartmentu, včetně okyselení lysozomálního lumenu a transportu aminokyselin, mastných kyselin, sacharidů a dalších živin vznikajících hydrolytickou degradací lysozomálními hydrolasami (Eskelinen, Tanaka, & Saftig, 2003). Kromě toho mohou být lysozomální membránové proteiny zapojeny do interakce a fúze lysozomů se sebou samými nebo do interakce a fúze s dalšími buněčnými složkami, včetně endozomů, fagozomů a plazmatické membrány (Fukuda, 1991).

Kyselé ( $\text{pH} \leq 5$ ) vnitřní prostředí lysozomu je způsobeno obsahem kyselých hydrolas - vakuolární  $\text{H}^+$ -ATPasa (V-ATPasa) (Hraběta et al., 2020). Pro funkci lysozomů jsou nezbytné dvě třídy proteinů: rozpustné lysozomální hydrolasy (označované také jako kyselé hydrolasy) a integrální lysozomální membránové proteiny (LMPs).

Každá z 50 známých lysozomálních hydrolas cílí na specifické substráty pro degradaci a jejich společný účinek je odpovědný za celkovou katabolickou kapacitu lysozomu. Kromě hromadné degradace a zpracování proteinu se lysozomální

hydrolasy účastní cytosolické dráhy, ve které je zpracován antigen. Rovněž se hydrolasy podílí na degradaci extracelulární matrix a také na zahájení apoptózy (Conus & Simon, 2008).

LMPs se nacházejí převážně na lysozomální membráně a oplývají velkým a rozličným množstvím funkcí, které zahrnují okyselování lysozomálního lumenu, proteinový import z cytosolu, fúzi membrán a transport produktů degradace do cytoplazmy. Nejčastěji se objevující LMPs jsou s lysozomem asociované membránové proteiny LAMP-1 a LAMP-2, lysozomální integrovaný protein LIMP-2 a protein tetraspanin CD63. (Eskelinen et al., 2003).

S lysozomy asociovaný membránový protein 1 (LAMP-1) a LAMP-2 jsou hlavní proteinové složky lysozomální membrány. Jsou to transmembránové proteiny typu I s velkou lumenální doménou, jednou transmembránovou doménou a C-terminálním cytoplazmatickým ocasem. Konzervované cytosolické konce LAMP-1 a LAMP-2 obsahují potřebné informace pro jejich intracelulární cílení po biosyntéze (Hunziker, Simmen, & Höning, 1996).

Přítomnost obou LAMP molekul je jednou z hlavních definicí lysozomálního kompartmentu. Původně byly LAMP-1 a LAMP-2 považovány za ochránce lysozomální membrány proti hydrolytickým enzymům (Eskelinen, 2006). Nicméně deficientní buňky, kterým chybí oba LAMP proteiny mají stále intaktní lysozomy i když hustota vztlaku lysozomů je snížena (Eskelinen et al., 2005).

#### **2.4.4 LAMP 1**

LAMP-1 se skládá z velké lumenální části, která je oddělena pantovou oblastí bohatou na prolin ve dvou disulfid-obsahujících doménách, jednoho transmembránového segmentu a krátkého cytoplazmatického konce 11 aminokyselin. Konec obsahuje motiv Gly-Tyr kritický pro transport do lysozomů (Andrejewski et al., 1999).

Polypeptid LAMP-1 je složen z 382 aminokyselin, což odpovídá přibližně 42 kDa. Lumenální část polypeptidového řetězce obsahuje 16–20 potenciálních *N*-glykosylačních míst, z nichž většina je využita. Část glykanů je poly-laktosaminového typu a LAMP-1 je jedním z hlavních nosičů poly-*N*-acetyl-laktosaminů v buňkách (Lee,

Wang, & Fukuda, 1990). Zajímavé je, že obsah poly-N-acetyllaktosaminů v LAMP-1 koreluje s diferenciací a metastatickým potenciálem nádorových buněk.

Gen Lamp-1 je všudypřítomně exprimován s poněkud vyššími hladinami ve slezině, játrech a ledvinách. V makrofázích P388 tvoří LAMP-1 přibližně 0,1 % celkového buněčného proteinu, což odpovídá přibližně  $2 \times 10^6$  molekul LAMP-1 na buňku. Odhaduje se, že nadbytek LAMP-1 i LAMP-2 je dostatečně vysoký na to, aby vytvořil téměř kontinuální sacharidový povlak na vnitřním povrchu lysozomální membrány (Andrejewski et al., 1999). Ačkoli je LAMP-1 distribuován v buňce primárně v lysozomech, za určitých okolností (např. na cytotoxických T lymfocytech, po aktivaci krevních destiček,...), se také nachází na povrchu buněk (Febbraio & Silverstein, 1990).

LAMP-1 byl nalezen také na buněčném povrchu vysoce metastatických nádorových buněk. Předpokládá se, že LAMP exprimovaný na buněčném povrchu může sloužit jako ligand pro selektiny a může tak zprostředkovat události adheze/rozpoznávání buněk (Andrejewski et al., 1999).

#### **2.4.5 LAMP 2**

Jedním z hlavních nosičů poly-N-acetyllaktosaminů v buňkách je LAMP-2 (Fukuda, 1991). Ačkoli všudypřítomně exprimovaný LAMP-2 je za určitých okolností lokalizován primárně v pozdních endozomech a lysozomech, může se nacházet na buněčném povrchu, stejně tak jako LAMP-1. LAMP-2 byl popsán jako receptor pro selektivní import a degradaci cytosolických proteinů v lysozomu a také jako receptor pro chaperonem zprostředkovanou autofagii.

Stejně jako LAMP-1 se LAMP-2 skládá z velké lumenální části, jednoho transmembránově překlenujícího se segmentu a krátkého cytoplazmatického konce o 11 aminokyselinách (Eskelinen et al., 2002).

LAMP-2, stejně jako LAMP-1, byl po dlouhou dobu považován za zásadní protein pro ochranu lysozomální membrány před kyselým prostředím lumen. Nicméně studie efektu samotného a kombinovaného nedostatku LAMP u myši však odhalila alternativní funkce. LAMP proteiny, ale zejména LAMP-2, jsou důležitými regulátory při úspěšném zrání autofagozomů i fagozomů. Nedostatek LAMP-2 způsobuje akumulaci autofagozomů v mnoha tkáních. To vede ke kardiomyopatii a myopatii



u myši a pacienti kvůli tomu trpí Danonovou nemocí. Ústřední roli LAMP-2 podtrhuje také studie, ve které se ukázalo, že myši mající knockoutovaný protein LAMP-2 mají zhoršenou fagozomální maturaci v neutrofilech. Porucha tohoto důležitého procesu vrozené imunitní obrany u těchto myši vedla k paradentóze. Zpožděná clearance bakteriálních patogenů byla pravděpodobně způsobena neúčinnou fúzní kapacitou mezi lysozomy a fagozomy.

Studie s dvojitými knockoutovanými LAMP fibroblasty naznačují, že nedostatek LAMP zhoršuje transport lysozomů zprostředkovaný dyneinem do perinukleárních oblastí, kde dochází k fúzi s (auto)fagozomy (Saftig, Beertsen, & Eskelinen, 2008).

#### **2.4.6 (H<sup>+</sup>)-ATPasa**

Eukaryotické buňky vyvinuly rodinu protonových pump závislých na ATP známých jako vakuolární (H<sup>+</sup>)-ATPasy (nebo V-ATPasy), aby regulovaly pH intracelulárních kompartmentů, extracelulárního prostoru a cytoplazmy. V-ATPasy přítomné v intracelulárních kompartmentech jsou důležité pro normální buněčné procesy, jako jsou receptorem zprostředkované endocytózy, intracelulární membránový provoz, zpracování a degradace proteinů a spřažený transport malých molekul a iontů.

Rovněž usnadňují vstup řady obalených virů a bakteriálních toxinů, včetně viru chřipky a antraxového toxinu do buňky. V-ATPasy přítomné v plazmatických membránách buněk jsou také důležité v normální fyziologii. Ulehčují resorpci kostí osteoklasty, sekreci kyselin interkalátovými buňkami ledvin, pH homeostázu v makrofázích a neutrofilech, angiogenezi endotelovými buňkami a zrání a skladování spermií v mužské reprodukční soustavě.

V-ATPasy z plazmatické membrány jsou obzvláště důležité u lidských onemocnění, přičemž genetické vady V-ATPas se projevují například jako onemocnění osteoklastů, což vede k osteopetróze. V-ATPasy z plazmatické membrány se také podílejí na invazi nádorových buněk. V-ATPasy se tak objevují jako potenciální cíle v léčbě nemocí, jako je osteoporóza a rakovina (Hinton, Bond, & Forgac, 2009).

## 2.5 Lysozomální sekvestrace slabých hydrofobních bází

Schopnost lysozomů pohlcovat a akumulovat slabé hydrofobní báze fyzikálně-chemickým procesem známým jako lysozomální akumulace nebo lysozomální sekvestrace poprvé popsali de Duve et al. v článku vydaném roku 1974 (Kazmi et al., 2013). Bylo prokázáno, že lysozomy sekvestrují hydrofobní, slabě bazická chemoterapeutická léčiva prostřednictvím neenzymatického a transportérem nezprostředkovaného mechanismu (Halaby, 2019).

Mnoho léků používaných k léčbě malignit je slabou bází a bylo prokázáno několika publikacemi, že jsou akumulovány v lysozomech. Mezi látky mající vlastnosti slabé hydrofobní báze patří mimo jiné i následující léky: daunorubicin, doxorubicin, lapatinib, vinkristin, nintedanib, , vinblastin a mitoxantron (Halaby, 2019; Larsen et al., 2000). Následkem hodnoty jejich pK (mezi 7 a 9) je podstatná část molekul nenabitá při normálním intracelulárním pH, což jim umožňuje volně pronikat přes membrány cytoplazmatických organel a vezikul. Když lék narazí na kyselé prostředí, jako je například vnitřek lysozomů, přemění se protonizací na nabitou formu, která již není schopna překonat vnitřní membrány.

To má za následek akumulaci těchto protinádorových látek v cytoplazmatických organelách. Po sekvestraci následuje transport látky na povrch buňky a její vytlačení do extracelulárního prostředí. Jelikož rovnováha mezi nenabitou a nabitou formou léčiva závisí na pH, je akumulace léčiva v kyselých vezikulách podporována vysokým gradientem pH mezi cytoplazmou a kyselými kompartmenty. Okyselení cytoplazmy a/nebo alkalizace kyselých vezikul naopak snižuje akumulaci léčiva v těchto organelách. (Larsen et al., 2000).

Existují nejméně čtyři možné způsoby, jak se léčiva nejen s povahou slabých hydrofobních bází mohou dostat do lysozomu a akumulovat se tam. Tři z těchto cest zahrnují přenos léčiva přímo z buněčného cytosolu. Jmenovitě se jedná o (1) pasivní difúzi, (2) autofagocytózu (s následnou fúzí s lysozomy) a (3) transport léčiva pomocí transportního proteinu spojeného s lysozomální membránou a orientovaného tak, aby usnadňoval transport molekul do prostoru lysozomálního lumen. Čtvrtou možnou cestou je endocytóza probíhající z extracelulární tekutiny, která je jediným dostupným

mechanismem pro velké a/nebo pro membránu nepropustné sloučeniny, jak se dostat do lysozomu (Kaufmann & Krise, 2007).

Lysozomální sekvestrace je považována za jednu z příčin potlačení cytotoxického účinku léků s povahou slabé hydrofobní báze, což vede ke vzniku mnohočetné lékové rezistence (Zhitomirsky & Assaraf, 2015).

Nejen že se protinádorová léčiva s povahou slabých hydrofobních bází vysoce sekvestrují v kyselých lysozomech, ale bylo dokonce zjištěno, že akumulace těchto látek v lysozomech indukuje lysozomální biogenezi zprostředkovanou TFEB, což výrazně zvyšuje počet lysozomů v buňce. Biogenezí lysozomů zesílená lysozomální akumulace chemoterapeutik vede ke zvětšení lysozomální kapacity buňky. U takto nabuzené buňky byla vlivem akumulace vyvolána mnohočetná léková rezistence.

Vzhledem k tomu, že se o osudu léčiv akumulovaných v lysozomech ví jen málo, byl dokonce navržen model, který popisuje, jak mohou být izolovaná léčiva vyloučena z rakovinotvorných buněk prostřednictvím lysozomální exocytózy. Sledováním subcelulární lokalizace lysozomů během expozice lysozomotropním chemoterapeutikům bylo ukázáno, že akumulace léčiva vede k translokaci lysozomů z perinukleární zóny směrem k plazmatické membráně. Po translokaci na plazmatickou membránu fúzovaly lysozomy s plazmatickou membránou a následně uvolnily svůj obsah do extracelulárního prostředí. Tato zjištění naznačují, že lysozomální exocytóza je zásadní složkou lysozomem zprostředkované mnohočetné lékové rezistence (Zhitomirsky & Assaraf, 2017).

## 2.6 Chemoterapeutika v boji proti rakovině

Chemoterapeutik používaných k léčbě nádorových onemocnění je více než 100 druhů a jejich počet neustále narůstá. Chemoterapeutika mohou být rozdělena na léky s relativně širokou, necílenou specificitou, a na léky cílené, vyvinuté na základě přesnějšího chápání jednotlivých druhů rakoviny a zaměřené na specifické molekulární cíle v různých rakovinných buňkách. Necílená chemoterapie je známá také jako konvenční chemoterapie (Baldo & Pham, 2013).

Konvenční chemoterapie, i když je zaměřena na určité makromolekuly nebo enzymy, obvykle účinně nerozlišuje mezi rychle se dělícími normálními buňkami a nádorovými buňkami, což vede k toxickým vedlejším účinkům (Arora & Scholar, 2005). Odpovědi nádorů na cytotoxickou chemoterapii jsou obvykle částečné, krátké a nepředvídatelné (Arora & Scholar, 2005).

Naproti tomu cílená terapie interferuje s molekulárními cíli, které mají roli v růstu nebo progresi nádoru. Tyto cíle jsou obvykle lokalizovány v nádorových buňkách. Cílené terapie tedy mají vysokou specificitu vůči nádorovým buňkám a poskytují širší terapeutické okno s menší toxicitou. Jsou také často užitečné v kombinaci s cytotoxickou chemoterapií nebo ozařováním a to jako léčba aditivní nebo synergická. Profily toxicity cílené terapie se totiž moc často nepřekrývají s tradiční cytotoxickou chemoterapií. Cílená terapie tedy představuje nový a slibný přístup k léčbě rakoviny, který již vede k příznivým klinickým účinkům. Existují 2 typy cílené terapie, monoklonální protilátky (např. herceptin, rituximab) a nízkomolekulární inhibitory jako jsou inhibitory tyrosinových kinas (např. imatinib, dasatinib) (Finley, 2003).

### **2.6.1 Cílená chemoterapie**

Tradiční cytotoxická chemoterapie funguje především prostřednictvím inhibice buněčného dělení. Naproti tomu cílená terapie blokuje proliferaci rakovinných buněk interferencí se specifickými molekulami potřebnými pro vývoj a růst nádoru. Některé z těchto molekul mohou být přítomny v normálních tkáních, ale v nádorech jsou často mutovány nebo nadměrně exprimovány (Gerber, 2008).

Hlavními požadavky na léčbu rakoviny byly vždy specifičnost a cílení léčby přímo na rakovinné buňky bez doprovodné toxicity. Tyto požadavky byly realizovány se zavedením léčby monoklonálními protilátkami (mAb) a nízkomolekulárními inhibitory, které cílí na molekuly signální transdukce. Signální transdukce využívá biochemicky indukované signály generované řadou velkých i malých molekul (např. růstové faktory, neurotransmitery, hormony, cytokiny,...), které jsou zahrnuty do celé řady buněčných reakcí (buněčné dělení, metabolické změny, genová exprese, smrt buňky). Terapie nízkomolekulárními inhibitory signální transdukce pak závisí na identifikaci signálních proteinů a jejich změněných drah. První signální proteiny, které měly být použity jako cíle pro novou generaci unikátních protinádorových léčiv, byly proteinkinasy (Baldo & Pham, 2013).

### **2.6.2 Monoklonální protilátky**

Jedním ze způsobů, jak specificky najít protein, který je deregulován během tumorigeneze, je produkce monoklonální protilátky proti cílovému proteinu. Byly vytvořeny monoklonální protilátky, což jsou cílená chemoterapeutika, cílící na širokou škálu proteinů, které se podílejí na specifických druzích rakovin. Existují tři hlavní mechanismy narušení funkce rakovinové buňky a to protilátkově závislá cytotoxicita, na kompartmentu závislá cytotoxicita a přerušení funkce proteinu a tím možné následné signalizace.

Terapie monoklonálními protilátkami využívá velkého množství protilátek, které jsou generovány in vitro. Jedná o větší množství protilátek než je těch, které vytváří vlastní imunitní systém pacienta.

První monoklonální protilátky byly vyrobeny v laboratoři fúzí myší rakovinné buňky (myelomu) s myší B buňkou za vzniku hybridomu. Všechny původní monoklonální protilátky byly vytvářeny pomocí myších buněk, zatímco současné protilátky jsou buď humanizované nebo plně lidské, což je činí bezpečnějšími a účinnějšími pro léčbu lidí. V současnosti existuje řada předklinických a klinických studií zahrnujících monoklonální protilátky pro téměř každý typ rakoviny (Baudino, 2015).

### **2.6.3 Nízkomolekulární inhibitory**

Jednou z příčin přeměny normální buňky na rakovinnou je nevhodná kinasová aktivita, díky které buňka obejde omezení normálního buněčného cyklu. Nízkomolekulární inhibitory nebo též malé molekulární inhibitory patří do skupiny cílených chemoterapeutik a cílí na proteiny, které se během progresu rakoviny staly buď neregulované nebo upregulované (např. BCR-ABL). Jakmile se tyto molekuly navážou na svůj specifický cíl, deaktivují tyrosinkinasovou doménu, čímž zabrání průběhu navazujících signálních drah (Baudino, 2015).

Tyrosin kinyasy hrají rozhodující roli v modulaci signalizace růstového faktoru. Aktivované formy těchto enzymů mohou způsobit zvýšení proliferace a růstu nádorových buněk, mohou vyvolat antiapoptotickou aktivitu a mohou podporovat angiogenezi a tvorbu metastáz. Kromě aktivace růstovými faktory je běžným mechanismem geneze nádoru aktivace proteinkinasy somatickou mutací. Protože všechny tyto účinky jsou iniciovány aktivací receptorové tyrosinkinasy, jsou klíčovým cílem inhibitorů.

Tyrosinkinasy jsou enzymy, které katalyzují přenos skupiny  $\gamma$  fosfátů z adenosintrifosfátu na cílovou bílkovinu. Hrají důležitou roli v různých normálních buněčných regulačních procesech.

Tyrosinkinasy lze klasifikovat jako receptorové proteinové kinyasy a nereceptorové proteinové kinyasy. Receptorové tyrosinkinasy jsou membránové proteiny buněčného povrchu, které hrají klíčovou roli v přenosu extracelulárních signálů do cytoplazmy (Pawson, 2002).

Bylo identifikováno přibližně 60 receptorových tyrosinkinasy a jsou rozděleny do přibližně 20 podskupin - jsou definovány receptorem a/nebo ligandem.

Charakterizovány jsou sekvencemi podobnými imunoglobulinům v jejich amino-koncových extracelulárních doménách, lipofilním transmembránovým segmentem a intracelulární karboxy-terminální doménou, která zahrnuje katalytické místo tyrosinkinasy. Nereceptorové tyrosinkinasy na druhé straně přenášejí intracelulární signály (Arora & Scholar, 2005).

Receptorové tyrosinkinasy jsou multidoménové proteiny. Katalytická doména (vazebné místo komplexu Mg-ATP) se ukázala jako nejslibnější cíl pro design léčiv. Ačkoli je ATP vazebné místo vysoce konzervováno mezi tyrosin kinasami, drobné rozdíly v architektuře kinasových domén umožnily vývoj vysoce selektivních inhibitorů.

V 80. letech byly hlášeny objevy prvních přírodních inhibitorů tyrosinkinasy - quercetin a genistein. Od té doby bylo popsáno ohromné množství těchto přírodních i syntetických inhibitorů. (Madhusudan & Ganesan, 2004).

#### **2.6.4 Imatinib**

Imatinib patří mezi nízkomolekulární inhibitory. Je to syntetický inhibitor tyrosinkinasy používaný k léčbě chronické myeloidní leukémie (CML). Je specificky navržen tak, aby inhiboval fúzní protein BCR-ABL (Breakpoint Cluster Region-Abelson), který je výsledkem chromozomální abnormality známé jako filadelfský chromozom.

CML je charakterizována touto anomálií, která vede k abnormalitám periferní krve a kostní dřeně. Imatinib je schválen v mnoha zemích po celém světě k léčbě CML chronické fáze s pozitivním filadelfským chromozomem (Ph<sup>+</sup>), CML Ph<sup>+</sup> s akcelerovanou fází nebo blastickou krizí, u pacientů s CML s chronickou fází Ph<sup>+</sup>, kteří nereagovali na terapii interferonem- $\alpha$ , nebo v případě CML kdy se onemocnění opakuje po transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Imatinib je účinný a obecně je dobře snášen u pacientů s Ph<sup>+</sup> CML. Někteří pacienti se stávají rezistentními nebo nesnášenlivými vůči léčbě imatinibem, kdy jedním z možných mechanismů rezistence je lysozomální sekvestrace tohoto léčiva.

### 2.6.5 Necílená chemoterapie

Protirakovinné účinky klasických, necílených chemoterapeutik používaných v léčbě nádorového onemocnění závisí na schopnostech těchto látek zničit rychle a nekontrolovatelně se dělící rakovinné buňky. Necílená chemoterapeutika působí na nádorové buňky prostřednictvím jejich cytotoxických vlastností, popřípadě vyvolají v nádorové buňce apoptózu. Tato léčiva ovšem poškozují i normální rychle se dělící buňky, jako jsou buňky gastrointestinálního traktu, buňky kostní dřeně nebo vlasové folikuly. Poškození rychle se dělících buněk způsobuje známé vedlejší účinky, jako jsou mukozitida, stomatitida, myelosuprese a alopecie (Baldo & Pham, 2013).

Chemoterapie je spojena i s řadou závažných vedlejších účinků, které zahrnují okamžité příznaky toxicity a pozdní příznaky chronické toxicity. Jejich intenzita může být podle klasifikace WHO mírná (stupeň 1), střední (stupeň 2), těžká (stupeň 3) nebo život ohrožující nebo invalidizující (stupeň 4). Okamžité účinky lze pozorovat na kůži a vlasech, kostní dřeni a krvi, gastrointestinálním traktu a na ledvinách. Mohou být ovlivněny všechny orgány těla, včetně základních orgánů, jako jsou srdce, plíce a mozek. Neurotoxicita stupně 3 a 4 může vyvolat ospalost, parestézii, paralýzu, ataxii, křeče a kóma. Mezi chronické účinky chemoterapie dále patří rezistence na léky, karcinogenita a neplodnost (Schirmacher, 2019).

První používaná skupina nescifických protinádorových léčiv byla skupina alkylačních činidel, která způsobují poškození DNA. Dalšími skupinami nescifických chemoterapeutik jsou antimetabolity, rostlinné alkaloidy, topoizomerasové inhibitory a antracykliny (Baudino, 2015).



### 2.6.6 Alkylační činidla

Alkylační činidla jsou nejčastěji používanou skupinou necílených chemoterapeutik. Přestože jsou mechanismy účinku těchto sloučenin totožné, mohou existovat významné rozdíly v jejich klinických aktivitách. Tyto sloučeniny vedou k poškození nukleární i mitochondriální DNA přidáním alkylových skupin do řetězce DNA. Vložené alkylové skupiny vedou k zlomům v řetězcích DNA nebo díky jejich vložení dochází k bodovým mutacím, které převádějí páry bází C:G na páry bází T:A.

Když dojde k těmto změnám v DNA, buňka podstoupí buněčnou smrt. Příkladem alkylačních činidel je cisplatina, karboplatina, cyklofosfamid a oxaliplatina. Alkylační činidla nejsou specifická pro buněčný cyklus buňky a zaměřují se na všechny jeho fáze. Flexibilita jejich účinku umožňuje, aby byla tato činidla použita k léčbě širokého spektra rakovin. Alkylační činidla vykazují vyšší stupeň účinnosti proti leukémii a pomalu rostoucím solidním nádorům. S dlouhodobým používáním alkylačních činidel je spojeno několik úskalí, například neplodnost u mužů v důsledku snížené produkce spermií a ukončení menstruace u žen. Další nevýhodou je, že tyto sloučeniny mohou také zvýšit riziko vzniku sekundárních rakovin (Malhotra & Perry, 2003).

### 2.6.7 Antimetabolity

Antimetabolity jsou analogy prekurzorů nukleových kyselin nebo přímo analogy nukleových kyselin a patří do skupiny necílených chemoterapeutik. Stejně jako alkylační činidla způsobují antimetabolity poškození DNA napodobováním purinu. Antimetabolit se začlení do DNA nebo RNA a interferuje s replikací DNA a buněčným dělením.

Velkou komplikací při použití antimetabolitů k léčbě nádorů je, že antimetabolity postihují nejen rakovinné buňky, ale i všechny ostatní rychle se dělící buňky. Antimetabolity se obecně používají v léčbě hematologických malignit, jako jsou chronické a akutní leukémie. Antimetabolity jsou účinné také v léčbě nádorů prsu a trávicího ústrojí, stejně jako při léčbě zhoubných nádorů hlavy a krku. Běžně používaným antimetabolitem je methotrexát, který je strukturně příbuzný

folátu a inhibuje enzym dihydrofolátreduktasu. Tento enzym je nezbytný při metabolismu kyseliny listové, která je spolu se svými metabolity důležitým faktorem při syntéze DNA. Na rozdíl od alkylačních činidel, která ovlivňují buňku ve všech fázích cyklu, se methotrexát zaměřuje na S-fázi buněčného cyklu. Dva další běžně používané antimetabolity jsou merkaptopurin a 5-fluorouracil (5-FU). Merkaptopurin je analogem hypoxanthinu a používá se při léčbě akutní lymfoblastické leukémie (ALL). Další antimetabolit 5-Fluorouracil působí tak, že blokuje replikaci DNA, což zpomaluje růst a nakonec zabíjí rychle se dělící rakovinné buňky (Baudino, 2015; Lind, 2008).

### **2.6.8 Rostlinné alkaloidy a inhibitory topoizomeras**

Rostlinné alkaloidy, jak už název napovídá jsou sloučeniny odvozené z rostlin. Mechanismus účinku těchto léčiv se zaměřuje na buněčný cyklus. Na jakou fázi buněčného cyklu se zaměří ovšem závisí na tom, které konkrétní chemoterapeutikum se k léčbě použije. Rostlinné alkaloidy jsou necílená chemoterapeutika působící jako blokátory buněčného dělení, čímž zpomalují růst a progresi nádoru. Příkladem rostlinných alkaloidů jsou vinblastin a vinkristin mající původ v brčálu. Tyto sloučeniny se specificky zaměřují na M fázi buněčného cyklu a během buněčného dělení způsobují blokaci při sestavování tubulinu do mikrotubulů v mitotickém vřetenu. I když jsou tyto sloučeniny strukturně podobné, používají se jako terapeutická léčba odlišně. Vinblastin se používá k léčbě testikulárních karcinomů, zatímco vinkristin se používá k léčbě ALL a Ewingova sarkomu.

Inhibitory topoizomeras jsou chemoterapeutika, která se zaměřují na topoizomerasu typu I nebo typu II. Obě třídy fungují jako blokátory transkripce DNA. Inhibitory typu I působí tak, že vytvoří komplex s DNA topoizomerasou, čímž se účinně zablokuje aktivita topoizomerasy. Mezi inhibitory typu I patří kamptothecin a jeho analogy např. irinotecan a topotecan. Inhibitory typu II se zaměřují na přechod S- G2 buněčného cyklu. Příkladem inhibitorů typu II jsou etoposid a teniposid (Baudino, 2015).

### 2.6.9 Antracykliny

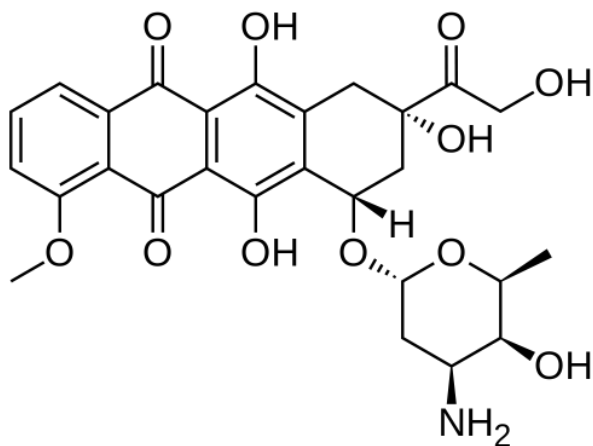
Antracykliny jsou léčiva na bázi daunosaminu a tetrahydronaftakendacionu a běžně se používají při léčbě vícečetných nádorových onemocnění včetně leukémie, lymfomu, rakoviny vaječnicků, rakoviny plic a prsu. Jedná se o necílená chemoterapeutika. Prvními objevenými antracykliny byly daunorubicin a doxorubicin, poté následoval vývoj mnoha dalších antracyklinů, včetně idarubicinu, epirubicinu a mitoxantronu.

Antracykliny mají tři odlišné mechanismy účinku. První způsob, jakým fungují, je generování volných kyslíkových radikálů, které způsobují poškození řetězců DNA a poškození buněčné membrány, což vede k apoptóze. Tyto sloučeniny se také interkalují do párů bází a účinně blokují syntézu DNA a RNA, čímž brání replikaci rakovinných buněk. Posledním mechanismem těchto sloučenin je inhibice aktivity enzymu topoizomerasy II. Topoizomerasa způsobuje uvolnění nadšroubovicového vinutí DNA, což umožňuje opravu DNA. Jakmile k tomu dojde, transkripce a replikace mohou pokračovat jako obvykle. Když je tento enzym blokován, nemůže docházet k transkripci a replikaci DNA, což nakonec vede k buněčné smrti.

Antracykliny mají několik závažných vedlejších účinků. Jedním z nich je možná kardiotoxicita, což vede k poškození srdečního svalu. K vyhnutí se tohoto nežádoucího vedlejšího účinku se antracykliny běžně podávají s dexrazoxanem, který působí jako kardioprotektant (Baudino, 2015).

### 2.6.10 Doxoubicin

První antracyklin byl izolován díky pigment-produkující bakterii *Streptomyces peucetius* na počátku 60. let a byl pojmenován daunorubicin (DNR). Krátce poté byl vyvinut jeho derivát doxorubicin (DXR). Obě léčiva obsahovala aglykonické a sacharidové skupiny.



Obr. 2. Vzorec doxorubicinu

Doxorubicin je jedním z nejúčinnějších antineoplastických léků, které jsou popsány samostatně nebo v kombinaci s jinými látkami. Jedná se o zástupce antracyklinů, který má nejširší spektrum účinnosti. Je to hydrofobní slabá báze a rovněž nespecifický tyrosinkinasový inhibitor. Doxorubicin se používá při léčbě tumorů a hematologických malignit, včetně nádorů prsu, žlučových, prostaty, dělohy, vaječníků, jícnu, nádorů žaludku a jater, dětských solidních nádorů, osteosarkomů a sarkomů měkkých tkání, Kaposiho sarkomu, stejně jako se používá při akutní myeloblastické a lymfoblastické leukémii a Wilmsově tumoru.

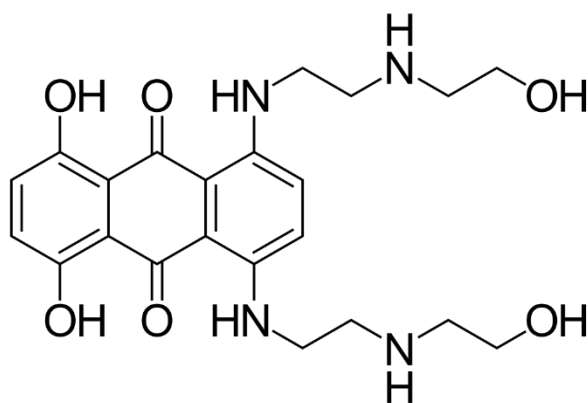
Mnoho studií přisuzovalo doxorubicinu protinádorovou aktivitu díky jeho schopnosti interkalovat do šroubovice DNA a/nebo kovalentně se vázat na proteiny zapojené do replikace a transkripce DNA. Takové interakce vedou k inhibici syntézy DNA, RNA a proteinů, což nakonec vede k buněčné smrti (Carvalho et al., 2009).

### 2.6.11 Mitoxantron

Mitoxantron je syntetický derivát antracenedionu, který vykazuje protinádorovou aktivitu proti širokému spektru rakovinných buněk in vitro i in vivo (Wiseman & Spencer, 1997). Jedná se o slabou hydrofobní bázi (Halaby, 2019) a rovněž o nespecifický tyrosinkinasový inhibitor.

Předpokládá se, že za jeho protinádorovou aktivitu je odpovědných několik mechanismů a to – (1) stabilizace intermediárního komplexu nukleové topoizomerasy II-DNA (čímž zabrání ligaci zlomů řetězců DNA), (2) generace volných radikálů, (3) agregace a zhutnění DNA elektrostatickým zesíťováním, (4) inhibice sestavení mikrotubulů a (5) inhibice aktivity proteinkinasy C.

Rezistence na protinádorovou aktivitu mitoxantronu byla pozorována jak in vitro, tak in vivo a může nastat řadou mechanismů. Ve studiích prováděných na potkanech nesoucích nádory prostaty měli ti, kteří byli léčeni mitoxantronem, významně snížený růst nádoru ve srovnání s kontrolami. Inhibice růstu nádoru byla ještě větší u potkanů, kterým byl podáván mitoxantron spolu s agonistou hormonu uvolňujícího luteinizační hormon. Tato kombinace se však nepoužívá u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty (Wiseman & Spencer, 1997).



Obr. 3. Vzorec mitoxantronu

## **Cíle práce:**

1. Vypracovat literární rešerši na téma: a) nádorová buňka a její charakteristické vlastnosti; b) mechanismy mnohočetné lékové rezistence; c) lysozomy a léková rezistence; d) vlastnosti vybraných protinádorových léčiv.
2. Zjistit, zda lysozomální sekvestrace protinádorových léčiv, jež mají povahu slabých hydrofobních bází a jsou v nanomolárních koncentracích, může indukovat jejich biogenezi.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Obecné informace k experimentální části

#### 3.1.1 Použité chemikálie a roztoky

- Doxorubicin – DXR (Sigma Aldrich, USA)
- Mitoxantron – MTX (MedChemExpress, USA)
- Imatinib – STI (Sigma Aldrich, USA)
- Concanamycin-A (Sigma Aldrich, USA)
- Albumin Fraction V (Carl Roth, Německo)
- Tetramethylrhodamine – TMRE (Sigma Aldrich, USA)
- 1x PBS (phosphate buffered saline): 130 mmol/l NaCl; 10 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,7 mmol/l KCl; 1,8 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4
- Tween 20 (Carl Roth, Německo)
- Rotiphorese®Gel 30 (37,5:1) (Carl Roth, Německo)
- N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine – TEMED (Sigma Aldrich, USA)
- Ribonuclease A from bovine pankreas (Sigma Aldrich, USA)
- FBS - Fetální bovinní sérum
- 97 % EtOH

#### 3.1.2 Použitá média

- Dulbecco's Modified Eagle's medium – high glucose (Sigma Aldrich, USA)
- RPMI-1640 Medium With L-glutamine and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (Sigma Aldrich, USA)

#### 3.1.3 Použitý materiál

- 6-jamkové kultivační desky
- Petriho misky
- Kultivační nádoby
- Fotografický světlocitlivý film (GE HealthCare)

### 3.1.4 Použité přístroje

- Inkubátor CelCulture (ESCO, USA)
- Laminární box MSC-Advantage (ThermoScientific, USA)
- Analyzátor počtu buněk a buněčné viability Vi-CELL TMXR (Beckman Coulter, USA)
- Centrifuga HERMLE Z 326 K centrifuga (LaborTechnik, Německo)
- Centrifuga BOEco M-240 (BioTech, Německo)
- Minicentrifuga myFuge™ (Benchmark Scientific, USA)
- Průtokový cytometr Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, USA)
- Digitalní váha DENVER MXX 612 (Merci, Česko)
- Magnetická míchačka RCT basic IKAMAG (Verkon, Česko)
- Thermoblock Bio-TDB 100 (BioSan, Lotyšsko)
- Vortex BioVortex V1 (BioSan, Lotyšsko)
- Spektrofotometr Epoch (BioTek, Nizozemsko)
- Zdroj napětí PowerPac HC (BioRad, USA)
- Aparatura pro western blotting TransBlot SD (BioRad, USA)
- Aparatura pro elektroforetickou separaci MiniProtean-3 cell (BioRad, USA)
- XDS-3FL fluorescenční mikroskop s kamerou (Olympus, Japonsko)

### 3.1.5 Použitá buněčná linie

#### Buněčná linie A549

Jedná se o epiteliální buněčnou linii lidského plicního adenokarcinomu. Tato buněčná linie byla založena v roce 1972 D. J. Giardem prostřednictvím explantátové kultury plicní karcinomatózní tkáně získán od 58letého bělošského muže (Martin & Sarkar, 2017). A549 je adherentní buněčná linie. Buňky byly zakoupeny z ECACC European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie) a byly pasážovány podle jejich protokolů v Dulbecco's Modified Eagle's mediu, které bylo obohaceno o antibiotika (penicilin, streptomycin) a 7% fetální bovinní sérum. Buňky byly převáděny do suspenze pomocí trypsinu dle protokolu ECACC.



## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Stanovení živých buněk pomocí TMRE**

Tetramethylrhodamin (TMRE) je fluorescenční barva, která vysoce fluoreskuje u buněk s vysokým mitochondriálním transmembránovým potenciálem (živých buněk) a málo fluoreskuje u buněk s nízkým mitochondriálním transmembránovým potenciálem (mrtvých buněk).

Do 1 ml suspenze buněk se přidal 1  $\mu$ l 100  $\mu$ M TMRE a vzorek se inkuboval 20 minut při 37 °C. Poté byl vzorek změřen na průtokovém cytometru.

### **3.2.2 Stanovení buněčného cyklu a jeho analýza**

Tato metoda využívá propidium jodid, který tvoří stechiometrický komplex s DNA a intenzita fluorescence toho komplexu je přímo úměrná obsahu DNA.

2 ml suspenze buněk se sedimentovalo (1600 RMP, laboratorní teplota, 5 minut). Sediment byl následně fixován v 96% EtOH (500  $\mu$ l) při -20 °C. Před analýzou se fixované buňky sedimentovaly (2500 RPM, laboratorní teplota, 5 minut). Sediment byl rozsuspendován v 450  $\mu$ l Vindelova roztoku. Inkubace vzorku probíhala při laboratorní teplotě po dobu 30 minut ve tmě. Následně byl vzorek měřen na průtokovém cytometru při 488/525 nm.

Použité roztoky:

- Vindelův roztok: 0,1 % (v/v) Triton X-100; 200  $\mu$ g/ml RNasa A; 20  $\mu$ g/ml propidium jodid; 1x PBS

### 3.2.3 Extrakce celkových proteinů

Zhruba  $3 \times 10^6$  suspenzních buněk bylo sedimentováno (1500 RPM, laboratorní teplota, 5 minut). Sediment byl promyt 4 ml chlazeného PBS (1500 RPM, laboratorní teplota, 5 minut). K promytému sedimentu bylo přidáno 100  $\mu$ l lyzačního RIPA pufru. Buňky byly inkubovány s RIPA pufrem po dobu 20 minut na ledu za občasného promíchání. Po buněčné lýzi byl buněčný lyzát přečištěn centrifugací (18000 RPM, 4 °C, 10 minut). U lyzátu byla určena koncentrace proteinů metodou Bradfordové a lyzát byl uskladněn při – 20 °C.

Použité roztoky:

- Lyzační RIPA pufr: 150 mmol/l NaCl, 1% Nonidet P-40, 50 mmol/l Tris, 50 mmol/l NaF, 5 mmol/l EDTA, 5 mmol/l pyrofosfát sodný dekahydrát (NAPP), inhibitory proteas

### 3.2.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

K 1  $\mu$ l přečištěného buněčného lyzátu byl přidán 1 ml roztoku Bradfordové. Následně byl vzorek inkubován po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo 200  $\mu$ l vzorku změřeno při absorbanci 595 nm na spektrofotometru. Jako blank byl použit roztok Bradfordové a kalibrace byla stanovena pomocí FBS.

Použité roztoky:

- Roztok Bradfordové: 50 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 ml methanolu; 100 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 850 ml deionizované vody – na 1 l roztoku

### **3.2.5 Stanovení exprese proteinů LAMP1, V-ATPasa, LAMP2 pomocí metody western blotting**

Vzorky získané z izolace celkových proteinů byly naředěny na požadovanou koncentraci vodou a poté byly denaturovány v termoblocku (95 °C, 5 minut) v přítomnosti Laemiho 6% loading pufru.

Připravené vzorky byly nanесeny na akrylamidový gel (7,4% SDS-polyacrylamidový separační gelem a 3,5% zaostřovací gel) následně byla provedena elektroforéza za přítomnosti SDS (SDS-PAGE, 80V/120V)

Po separaci byly tyto proteiny přeneseny z gelu na nitrocelulózu membránu pomocí Wet blottingu (0,15 A pro 1 membránu, 30 minut).

Membrána s přenesenými proteiny byla následně blokována po dobu 1 h v 5% blokovacím mléku s 1x PBS 0,1% Tween-20. Membrána byla rovněž promyta 10 minut v 1x PBS, 3x 10 minut v 1x PBS; 0,1% Tween-20, a nakonec 10 minut v 1x PBS.

Následně byla nanесena primární protilátka naředěná mlékem na doporučenou koncentraci.

#### **Primární protilátky**

- LAMP1 (D2D11) XP® Rabbit mAb (Cell signaling, USA): ředění 1:1000
- LAMP2 (D5C2P) XP® Rabbit mAb (Cell signaling, USA): ředění 1:1000
- ATP6V1B2 (D3O7Q) Rabbit mAb (Cell signaling, USA): ředění 1:1000
- GAPDH (D16H11) Rabbit mAb (Cell signaling, USA): ředění 1:1000

Membrána s primární protilátkou byla inkubována přes noc při 4 °C. Membrána promyta po dobu 10 minut v 1x PBS, 3x 10 minut v 1x PBS 0,1% Tween-20, a nakonec 10 minut v 1x PBS.

Po promytí byla nanесena na membránu sekundární protilátka, která je konjugovaná s enzymem. Sekundární protilátka, stejně jako primární, byla ředěna v mléce na doporučenou koncentraci.

#### **Sekundární protilátka**

- Polyclonal Swine anti-Rabbit immunoglobulins/HRP (horseradish peroxidase) (Dako): ředěn 1:2000

Membrána se se sekundární protilátkou inkubovala při laboratorní teplotě 1 h. Membrána byla opět promyta po dobu 10 minut v 1x PBS, 3x 10 minut v 1x PBS 0,1% Tween-20, a nakonec 10 minut v 1x PBS.

Použité roztoky a chemikálie:

- 1x PBS + 0,1% Tween 20 (1 l): 100 ml 10x PBS; 1 ml Tween 20; 900 ml deionizovaná voda
- Laemiho 6% loading pufr (12% SDS, 0,3 mol/l TRIS (pH 8,9); 0,3% bromofenolová modř; 60% glycerol; 0,75 mol/l DTT)
- Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)
- 10x Running pufr (1 l): 30 g TRIS; 145 g glycinu; 1 l deionizovaná voda
- Tank buffer: 100 ml 10x Running buffer; 10 ml 10% SDS; 900 ml deionizované vody
- Transfer pufr (Western blot): 100 ml 10x Running buffer; 200 ml metanol; 700 ml deionizovaná voda
- 5% blokovací mléko: 5 g sušeného mléka (bez tuku); 100 ml 1x PBS + Tween 20

### **3.2.6 Chemiluminiscenční detekce specifických proteinu**

Ve fotokomoře byl na nitrocelulózovou membránu s přenesenými proteiny nanesen ECL kit obsahující substrát pro křenovou peroxidasu navázanou na sekundární protilátku. Membrána byla inkubována s chemiluminescentním substrátem po dobu 10 minut ve tmě.

Na membránu byl poté přiložen světlo citlivý fotografický film. Po expozici byl film vložen do vývojky, následně do ustalovače a nakonec byl film omyt vodou. Takto vyvolaný film byl naskenován do počítače a byl vyhodnocen pomocí programu ImageJ.

Použité roztoky a chemikálie:

- ECL kit (GE HealthCare, UK)
- Vývojka: G354 (AGFA)
- Ustalovač: G150 (AGFA)

### 3.2.7 Stanovení počtu lysozomů.

Pro zvýraznění lysozomů byla vybrána protilátka proti LAMP-1, kdy protein LAMP-1 je lysozomální markerový protein, který se nenachází v žádné jiné buněčné organelle.

Skličko porostlé ovlivněnými buňkami A549 bylo opláchnuto v chlazeném 1x PBS, a poté bylo skličko umístěno do skleněné komůrky s 3,7% formaldehydem. Skličko bylo v komůrce s formaldehydem inkubováno přes noc při 4 °C.

Následně bylo skličko opět omyto chlazeným 1x PBS. Na skličko bylo nanášeno přibližně 50 µl permeabilizačního roztoku.

Skličko s roztokem bylo přikryto parafilmem a bylo 10 minut inkubováno při 4 °C. Skličko bylo opět omyto chlazeným 1x PBS a poté na něj bylo nanášeno 20 µl roztoku s primární protilátkou.

Skličko bylo opět zakryto parafilmem a 1 h bylo s protilátkou inkubováno při 4 °C. Po inkubaci bylo omyto v chlazeném 1x PBS a poté bylo na skličko přidáno 80 µl roztoku se sekundární protilátkou. Skličko bylo zakryto parafilmem a bylo inkubováno při 4 °C po dobu 1 h.

Po inkubaci bylo skličko naposledy omyto v chlazeném PBS a na skličko bylo nanášeno 20 µl roztoku (1x PBS, 1,6 µM DAPI, glycerol).

Podložní skličko s buňkami bylo přikryto krycím skličkem, které bylo po okrajích zalepeno lepidlem – chemoprenem, jako ochrana před vyschnutím preparátu.

Preparát byl uchován při 4 °C a pozorovat ho bylo možné až po 24 h, kdy dostatečně zaschl chemopren. Lysozomy byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem, bylo analyzováno minimálně 30 buněk kdy pomocí obrazové analýzy (v programu malování) byl stanoven počet lysozomů.

Použité roztoky a chemikálie:

- Permeabilizační roztok: 1x PBS; 0,1% nonidetu; 5% albumin
- Roztok s primární protilátkou: 1x PBS; 0,1% nonidetu; 5% albumin, primární protilátka stejně jako u westren blottu – ředění 1:50
- Roztok se sekundární protilátkou: 5% albumin; 1x PBS; 0,1% sekundární protilátka – FITC – ředění 1:1000

### 3.2.1 Stanovení akumulace léčiva v lysozomech

Nejprve 10 ml buněk o koncentraci 450 000 - 500 000 buněk/ml bylo preinkubováno při 37 °C po dobu 5 hodin v růstovém médiu s požadovanou koncentrací DXR/MTX a v přítomnosti nebo absenci concanamycinu-A.

Následně proběhla inkubace preinkubovaných buněk s 3 $\mu$ M STI po dobu 3 h.

Následovala separace buněk od růstového média přes vrstvu silikonového oleje centrifugací (5000 RPM, laboratorní teplota, 15 minut). Separované buňky byly extrahovány pomocí chlazeného extrakčního roztoku (1 % kyselina mravenčí, 50 % etanol). Buněčný extrakt byl přečištěn (18000 RPM, 4 °C, 10 minut), zředěn extrakčním roztokem a obsah imatinibu byl analyzován kapalinovou chromatografií spojenou s nízkoenergetickým kolizním tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC/MS/MS).

Absolutní akumulace slabé hydrofobní báze (MTX nebo DXR) v lysozomech byla zjištěna tak, že hodnota intracelulární akumulace MTX/DXR v přítomnosti concanamycinu-A (obsah léčiva v buňce kromě lysozomů), byla odečtena od hodnoty intracelulární akumulace MTX/DXR v nepřítomnosti concanamycinu-A (obsah léčiva v buňce včetně lysozomů). Concanamycin-A je inhibitorem vakuolární H(+)-ATPasy. Absolutní akumulace MTX/DXR v lysozomech byla vyjádřena jako molární množství konkrétní slabé hydrofobní báze v lysozomech na 10<sup>6</sup> buněk.

## 4 Výsledky

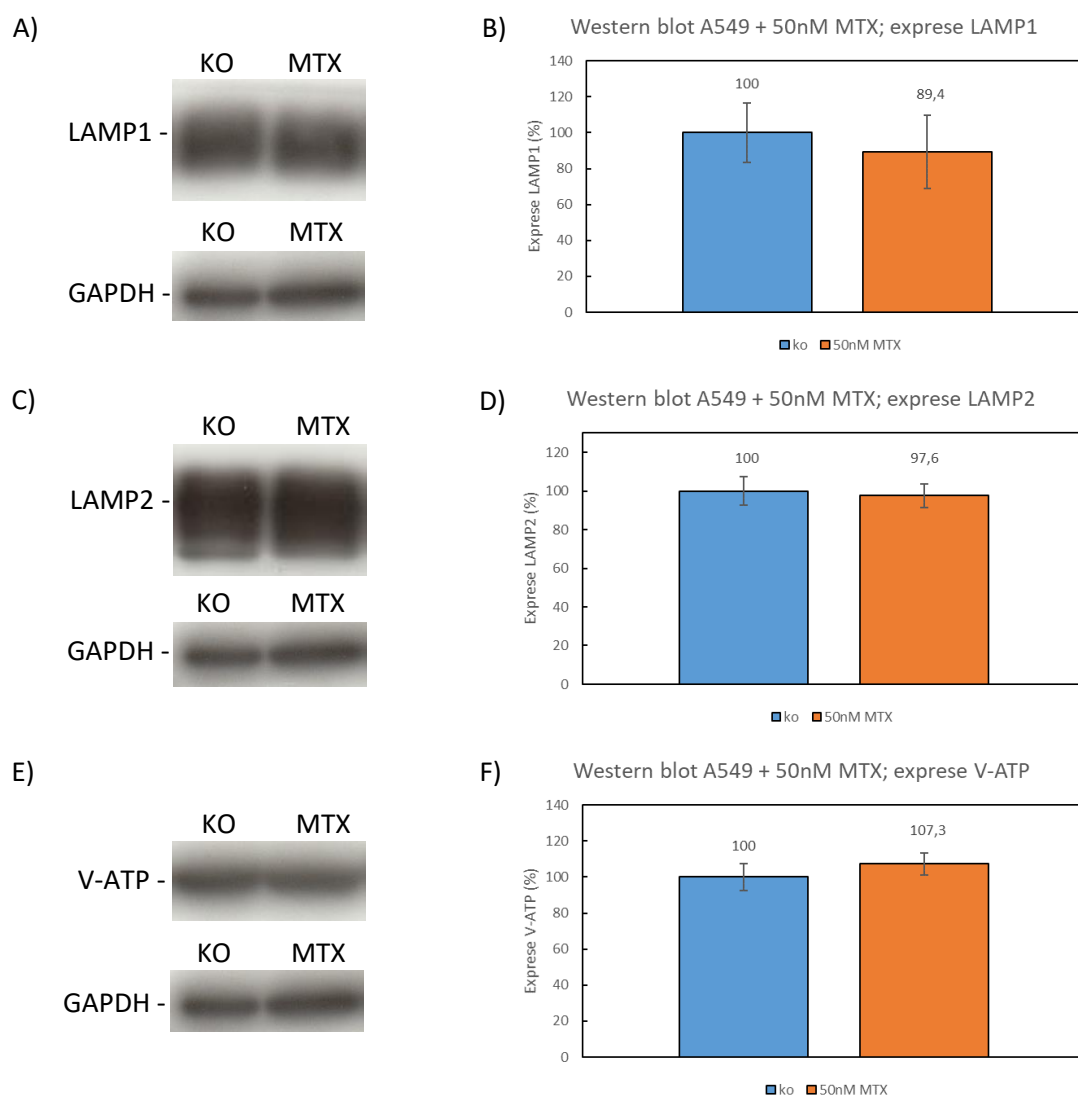
Lysozomy jsou organely, které se podílejí na mnoha buněčných procesech. V rámci svého fungování dynamicky mění svůj počet a velikost, pohybují se napříč cytoplazmou a podle potřeby interagují s jinými buněčnými strukturami a organelami.

TFEB kontrolovaná lysozomální biogeneze byla identifikována jako jedna z buněčných fyziologických reakcí na lysozomální stres (Sardiello et al., 2009). Takový stres může zahrnovat hladovění buňky, inhibici V-ATPasy a lysozomální alkalizaci způsobenou akumulací hydrofobních slabě bazických léčiv (Settembre et al., 2012; Zhitomirsky & Assaraf, 2015).

Výše uvedený stres je považován za hybnou sílu lysozomální biogeneze vyvolané nanomolárními koncentracemi hydrofobních slabě bazických chemoterapeutik (Zhitomirsky & Assaraf, 2015). Lysozomální alkalizace však vyžaduje masivní akumulaci hydrofobního slabě bazického léčiva, což je účinek, který byl pozorován pouze u vysokých (mikromolárních až milimolárních) nikoli nanomolárních koncentrací (Kazmi et al., 2013; Nadanaciva et al., 2011; Ohkuma & Poole, 1978). V naší laboratoři, kde se touto problematikou zabýváme, jsme zjistili, že jak absolutní, tak relativní lysozomální akumulace hydrofobních slabě bazických chemoterapeutik se zvyšuje s rostoucí extracelulární koncentrací a je obecně vysoká pouze při vysokých koncentracích (Nadanaciva et al., 2011; Ruzickova et al., 2019; Skoupa et al., 2020). Na základě těchto skutečností se nám nezdálo pravděpodobné, že by nanomolární koncentrace mitoxantronu, případně doxorubicinu mohly způsobit alkalizaci lysozomálního pH a indukovat tak lysozomální biogenezi. Vzhledem k tomu, že obě látky ovlivňují v nádorových buňkách řadu procesů pokusili jsme se o novou nerozporuplnou interpretaci publikovaných výsledků pomocí tří nezávislých metod a to analýzy exprese markerových lysozomálních proteinů, stanovení přímého počtu lysozomů a stanovení lysozomální kapacity pro hydrofobní chemoterapeutikum.

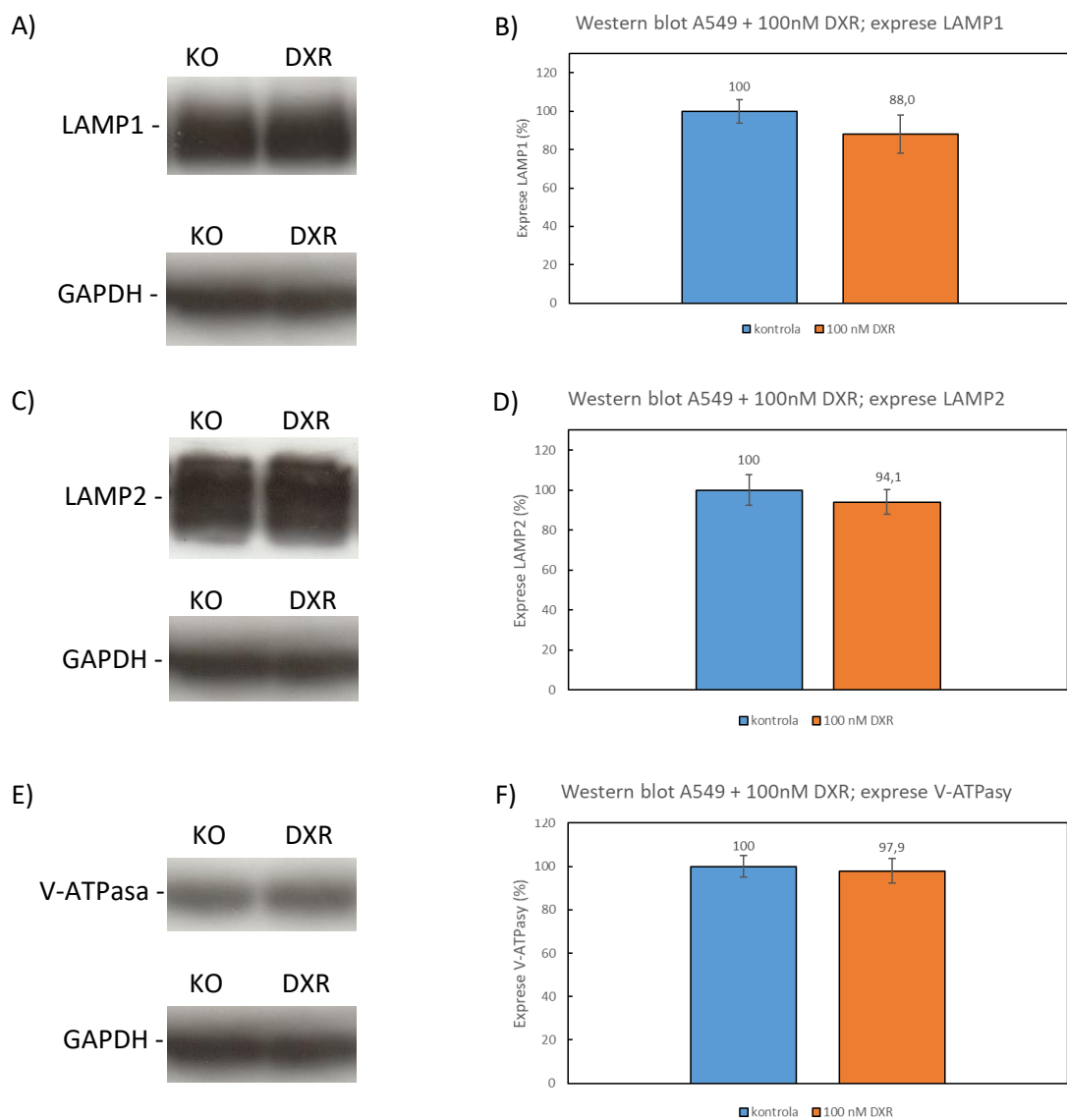
## 4.1 Analýza exprese markerových proteinů.

Nejprve jsme stanovovali expresi lysozomálních markerových proteinů po působení nanomolárních koncentrací MTX a DXR. Během analýzy exprese markerových proteinů LAMP-1, LAMP-2 a V-ATPasy pomocí western blottingu nebyl zjištěn signifikantní nárůst těchto proteinů v buňkách ovlivněných 50nM MTX (graf 1).



Graf 1. Analýza exprese lysozomálních markerových proteinů po působení mitoxantronu. Buňky A549 byly kultivovány v přítomnosti 50nM MTX. Po 24 hodinách byla udělána analýza exprese příslušných lysozomálních markerových proteinů pomocí western blottingu. Neovlivněné buňky A549 byly použity jako kontrola. A) Analýza exprese LAMP1 (typická analýza). B) Kvantitativní hodnocení exprese LAMP1, hodnoty sloupců jsou průměrné hodnoty ze 3 nezávislých experimentů se standardní odchylkou. C) Analýza exprese LAMP2 (typická analýza). D) Kvantitativní hodnocení exprese LAMP2, hodnoty sloupců jsou průměrné hodnoty ze 3 nezávislých experimentů se standardní odchylkou. E) Analýza exprese V-ATPasy (typická analýza). F) Kvantitativní hodnocení exprese V-ATPasy, hodnoty sloupců jsou průměrné hodnoty ze 3 nezávislých experimentů se standardní odchylkou.

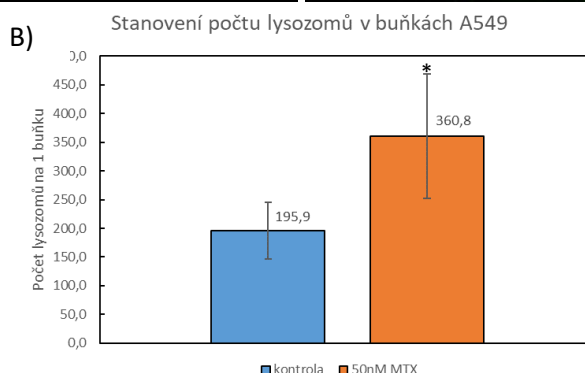
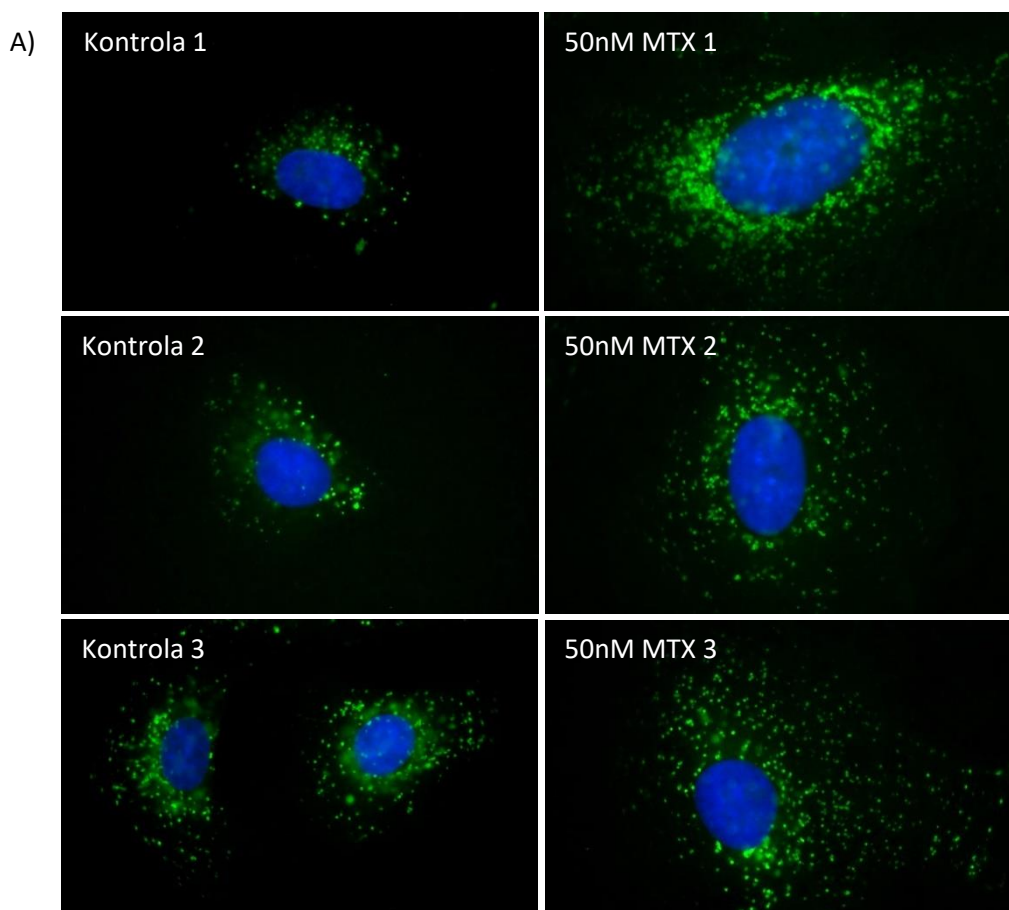




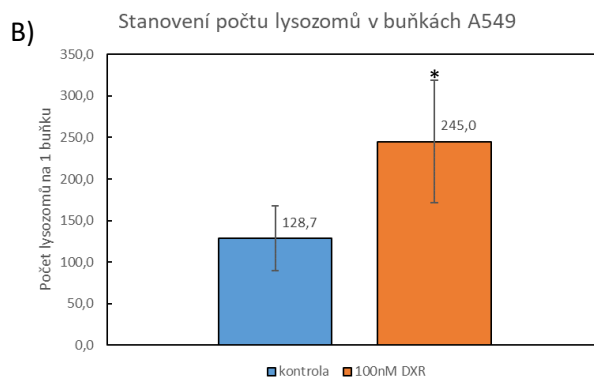
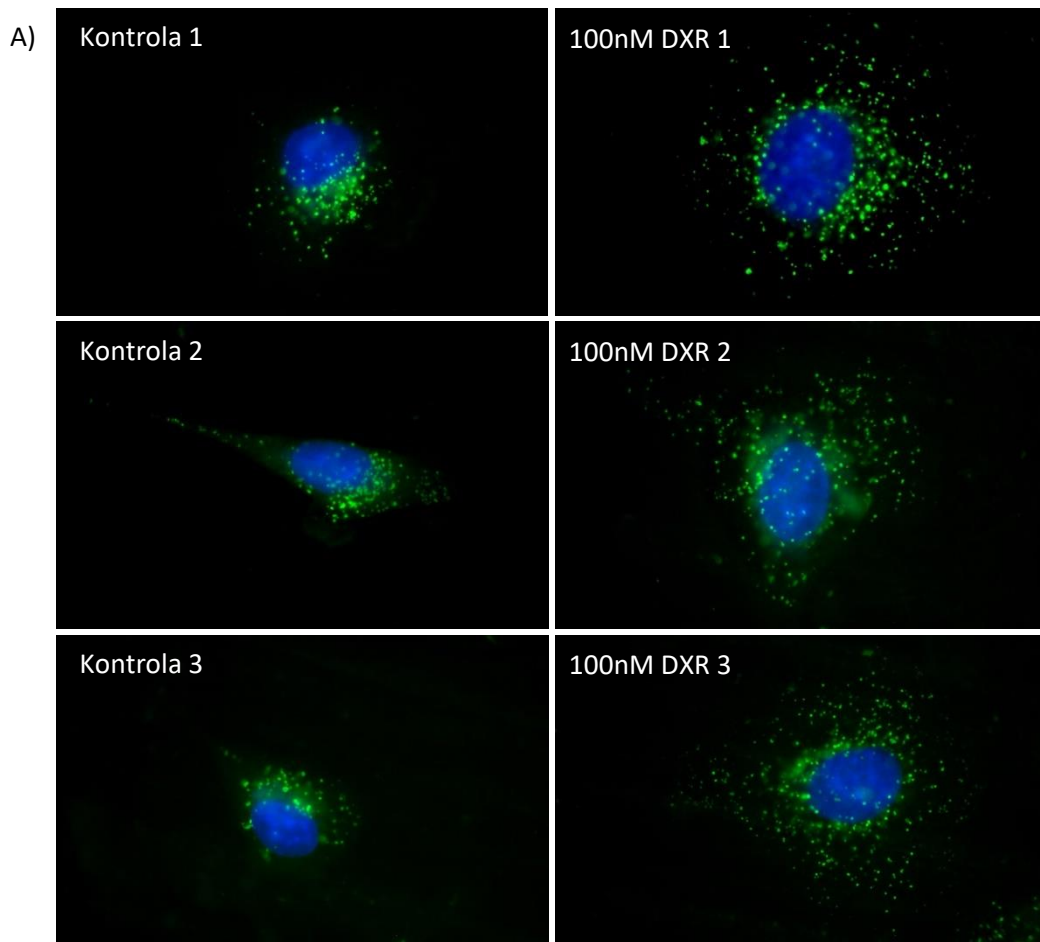
*Graf 2. Analýza exprese lyzozomálních markerových proteinů po působení mitoxantronu. Buňky A549 byly kultivovány v přítomnosti 100nM DXR. Po 24 hodinách byla udělána analýza exprese příslušných lyzozomálních markerových proteinů pomocí western blottingu. Neovlivněné buňky A549 byly použity jako kontrola. A) Analýza exprese LAMP1 (typická analýza). B) Kvantitativní hodnocení exprese LAMP1, hodnoty sloupců jsou průměrné hodnoty ze 3 nezávislých experimentů se standardní odchylkou. C) Analýza exprese LAMP2 (typická analýza). D) Kvantitativní hodnocení exprese LAMP2, hodnoty sloupců jsou průměrné hodnoty ze 3 nezávislých experimentů se standardní odchylkou. E) Analýza exprese V-ATPasy (typická analýza). F) Kvantitativní hodnocení exprese V-ATPasy, hodnoty sloupců jsou průměrné hodnoty ze 3 nezávislých experimentů se standardní odchylkou.*

## 4.2 Stanovení počtu lysozomů.

Dále jsme stanovovali přímý počet lysozomů v buňkách po působení nanomolárních koncentrací MTX a DXR. Zjistili jsme, že po působení MTX i DXR dochází k signifikantnímu nárůstu lysozomů na buňku. Tato metoda na rozdíl od předcházející ukazuje na signifikantní zvětšení lysozomálního kompartmentu, který by bylo možné interpretovat jako lysozomální biogenezi.



Graf 3. Stanovení počtu lysozomů. Buňky A549 byly kultivovány v přítomnosti 50nM MTX. Po 24 hodinách bylo provedeno stanovení počtu lysozomů. Neovlivněné buňky A549 byly použity jako kontrola. A) Vizualizace lysozomů (typické obrázky). B) Kvantitativní hodnocení počtu lysozomů v buňkách ovlivněných 50nM MTX, sloupce představují průměrný počet lysozomů v 35 buňkách se standardní odchylkou. Symbol \* značí signifikantní výsledek ( $p < 0,05$ ).

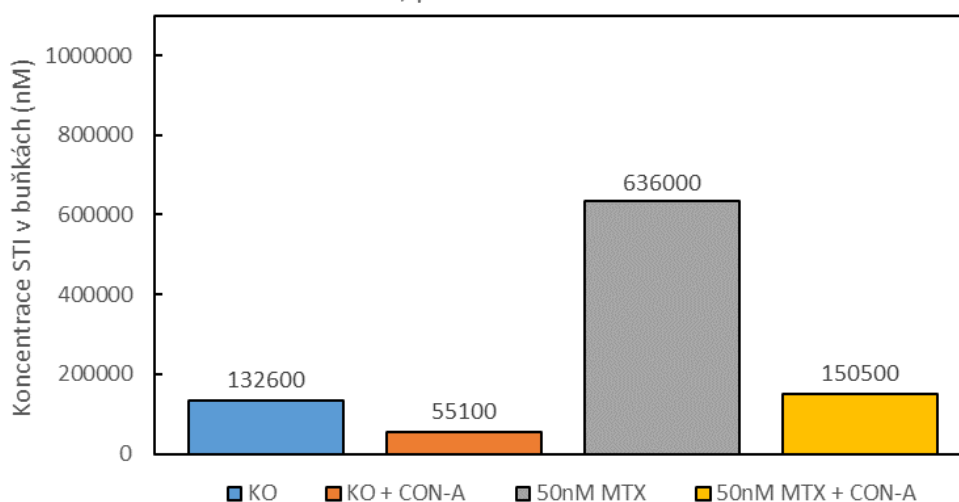


Graf 4. Stanovení počtu lysozomů. Buňky A549 byly kultivovány v přítomnosti 100nM DXR. Po 24 hodinách bylo provedeno stanovení počtu lysozomů. Neovlivněné buňky A549 byly použity jako kontrola. A) Vizualizace lysozomů (typické obrázky). B) Kvantitativní hodnocení počtu lysozomů v buňkách ovlivněných 50nM MTX, sloupce představují průměrný počet lysozomů v 35 buňkách. Symbol \* je označení pro signifikantní výsledek ( $p < 0,05$ ).

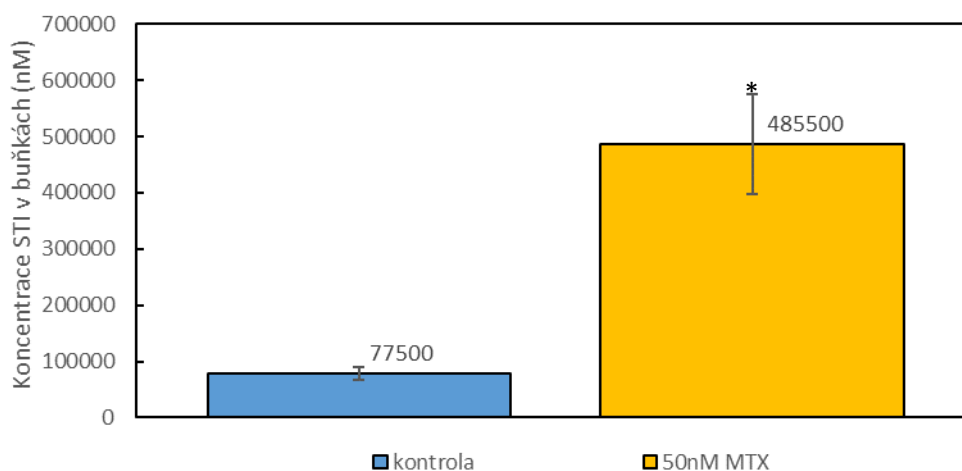
## 4.1 Sekvestrační kapacita lysozomů.

Dále jsme zjišťovali vliv nanomolárních koncentrací MTX a DXR na sekvestrační kapacitu lysozomů. Buňky ovlivněné MTX případně DXR byli kultivovány po dobu 3 hodin v STI a byla vypočtena sekvestrační kapacita lysozomů. Zjistili jsme, že jak MTX tak i DXR signifikantně zvýšil sekvestrační kapacitu pro STI (graf a graf). I tento výsledek poukazuje na nárůst sekvestrační kapacity pro imatinib, což by bylo možné hodnotit jako lysozomální biogenezi.

A) Intracelulární koncentrace A549 + 3 $\mu$ M STI; 3 HODINY +/- 25nM CON-A; preinkubace 50nM MTX

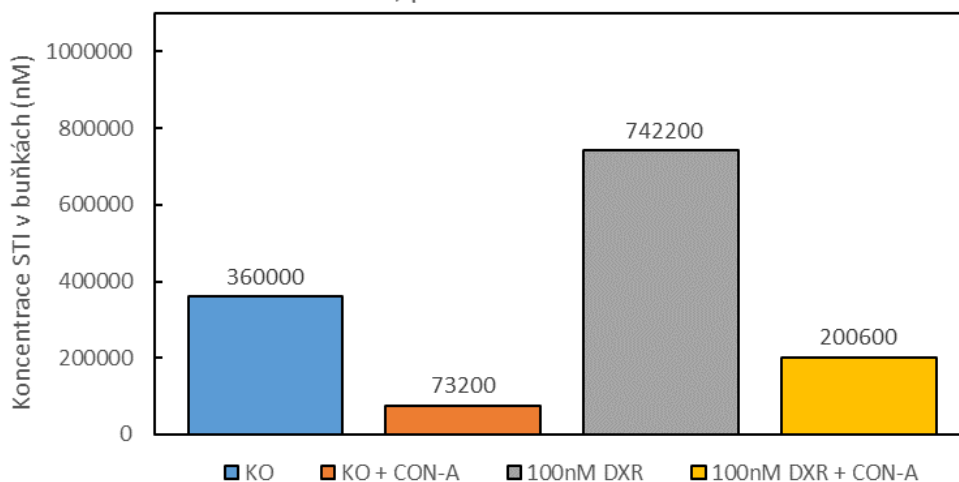


B) Akumulace STI v lysozomech buňek A549

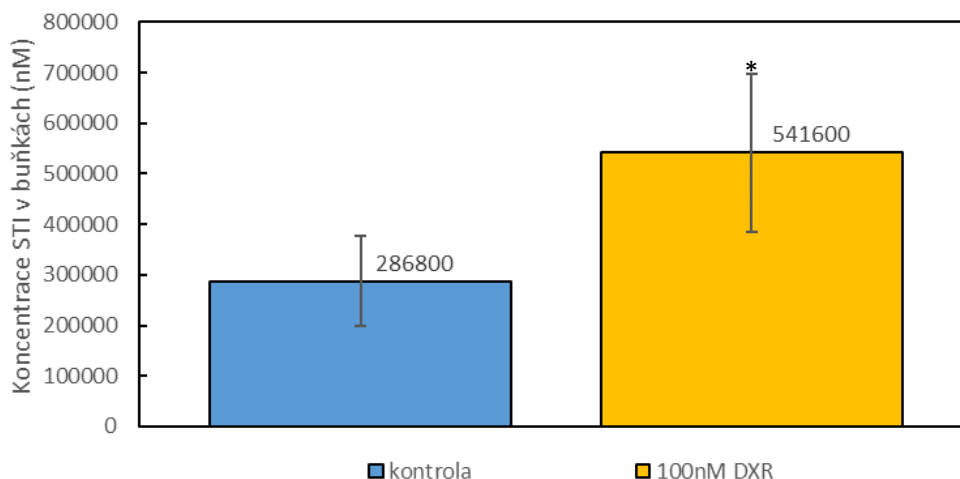


Graf 5. Sekvestrační kapacita lysozomů. Buňky A549 byly kultivovány v přítomnosti 50nM MTX a následně byla stanovena lysozomální sekvestrační kapacita pro imatinib. Neovlivněné buňky byly použity jako kontrola. A) Vliv concanamycinu-A na akumulaci imatinibu, sloupce představují průměrnou hodnotu množství imatinibu získanou ze 3 nezávislých analýz. B) Vypočítaná sekvestrační kapacita lysozomů, sloupce představují průměrné hodnoty ze 3 výpočtů včetně standardní odchylky. Symbol \* značí signifikantní výsledek ( $p < 0,05$ ).

A) Intracelulární koncentrace A549 + 3 $\mu$ M STI; 3 HODINY +/- 25nM CON-A; preinkubace 100nM DXR



B) Akumulace STI v lysozomech buňek A549

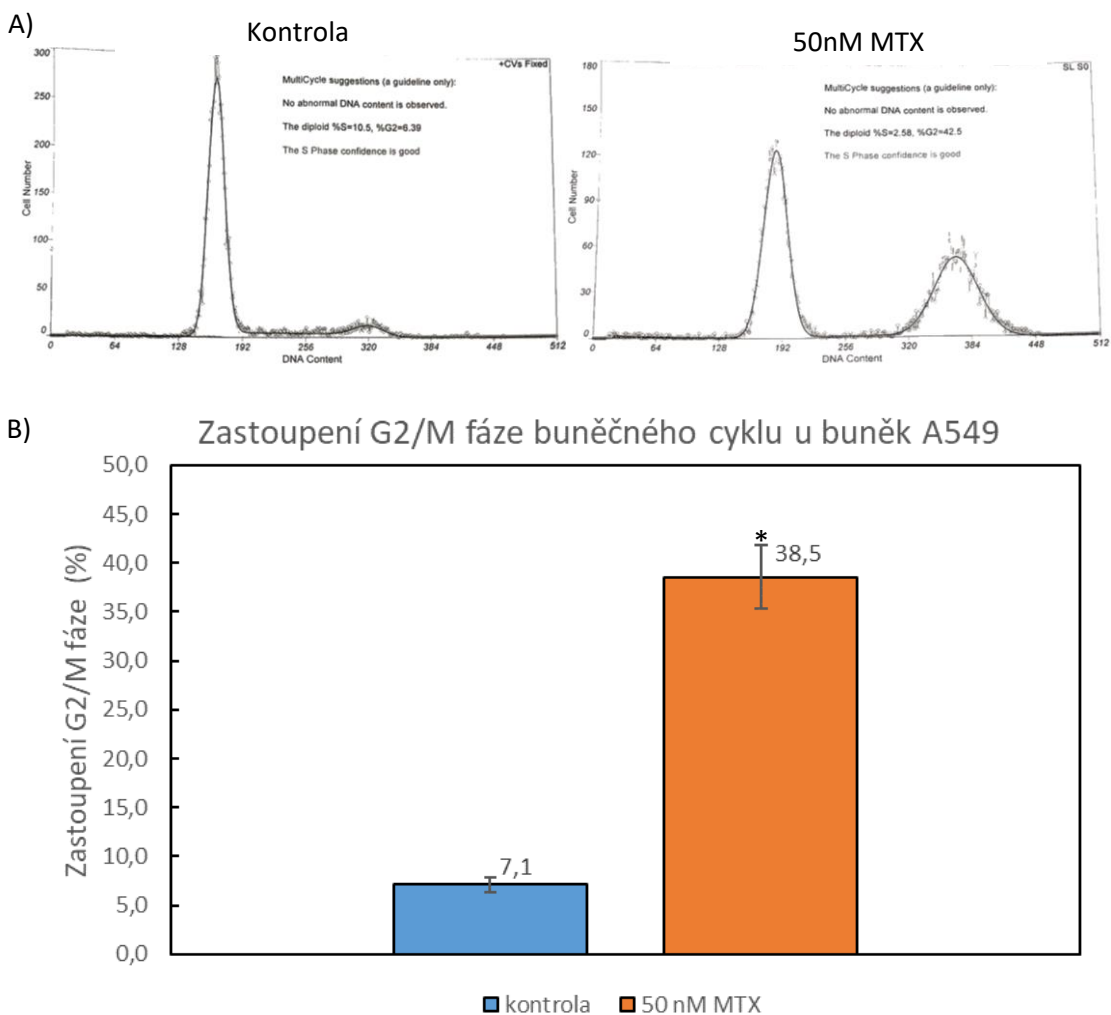


Graf 6. Sekvestrační kapacita lysozomů. Buňky A549 byly kultivovány v přítomnosti 100nM DXR a následně byla stanovena lysozomální sekvestrační kapacita pro imatinib. Neovlivněné buňky byly použity jako kontrola. A) Vliv concanamycinu-A na akumulaci imatinibu, sloupce představují průměrnou hodnotu množství imatinibu získanou ze 3 nezávislých analýz. B) Vypočítaná sekvestrační kapacita lysozomů, sloupce představují průměrné hodnoty ze 3 výpočtů včetně standardní odchylky. Symbol \* je označení pro signifikantní výsledek ( $p < 0,05$ ).

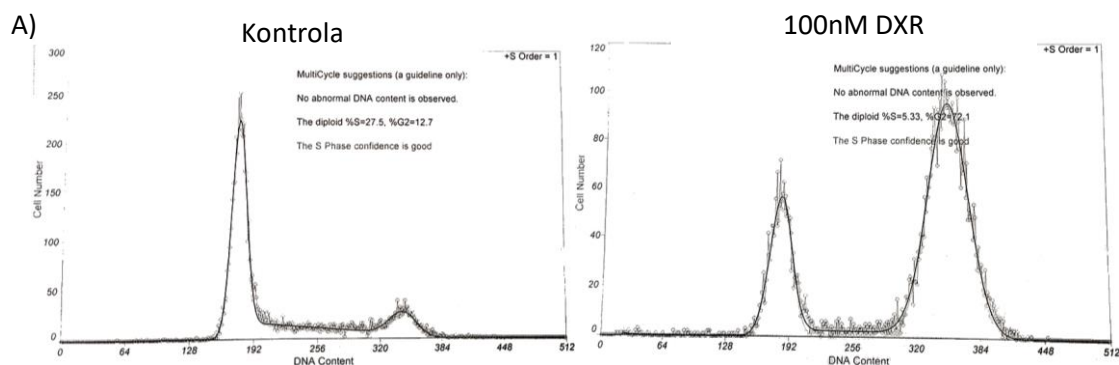
Kdyby skutečně docházelo k lysozomální biogenezi, všechny nezávislé metody pro zjištění biogeneze lysozomů by ji měly potvrdit, což se nestalo. Protože studované látky mají i řadu jiných účinků, mimo jiné se interkalují do DNA, pokusili jsme se získané výsledky interpretovat jiným nerozporuplným způsobem.

## 4.2 Analýza buněčného cyklu.

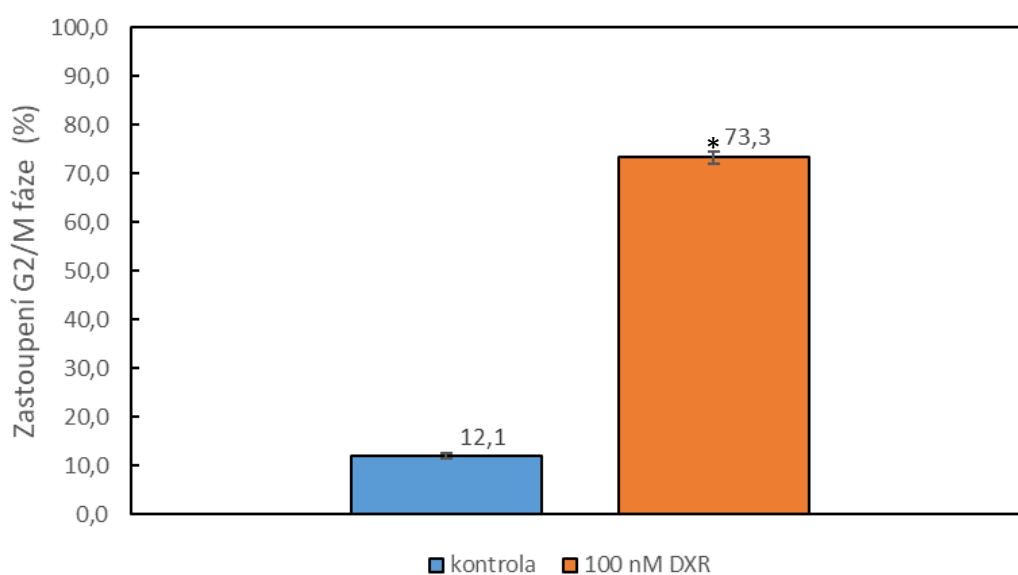
Studovali jsme vliv mitoxantronu a doxorubicinu na buněčný cyklus. Zjistili jsme, že obě látky způsobují masivní blok v G2/M fázi buněčného cyklu.



Graf 7. Analýza buněčného cyklu. Buňky byly kultivovány v přítomnosti 50nM MTX. Po 24h kultivaci byla provedena analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Neovlivněné buňky byly použity jako kontrola. A) Vliv MTX na buněčný cyklus (typická analýza). B) Zastoupení buněk v G2/M fázi buněčného cyklu, hodnoty sloupců jsou průměrné hodnoty ze 3 měření se standardní odchylkou. Symbol \* je označení pro signifikantní výsledek ( $p < 0,05$ ).



B) Zastoupení G2/M fáze buněčného cyklu buněk A549



Graf 8. Analýza buněčného cyklu. Buňky byly kultivovány v přítomnosti 100nM DXR. Po 24h kultivaci byla provedena analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Neovlivněné buňky byly použity jako kontrola. A) Vliv DXR na buněčný cyklus (typická analýza). B) Zastoupení buněk v G2/M fázi buněčného cyklu, hodnoty sloupců jsou průměrné hodnoty ze 3 měření se standardní odchylkou. Symbol \* značí signifikantní výsledek ( $p < 0,05$ ).

Toto zjištění skutečně umožňuje výsledky nerozporuplným způsobem interpretovat. Ve skutečnosti se buňky nachází v G2 fázi cyklu, kdy se buňka připravuje na mitózu a všechny struktury a kompartmenty má odpovídajícím způsobem zmnoženy.

## 5 Diskuze

V teoretické části této diplomové práce se pojednávalo o charakteristických vlastnostech nádorové buňky. Byly zde popsány možnosti léčby nádorových onemocnění a hlavní příčiny jejího selhání v souvislosti se vznikem mnohočetné lékové rezistence. Dále zde byly vysvětleny některé vybrané mechanismy vzniku MDR, zejména s ohledem na funkci lysozomů a jejich možného příspěvku ke vzniku MDR. V závěru teoretické části byla popsána struktura a mechanismus účinku chemoterapeutik, které byly použity v praktické části diplomové práce.

V experimentální části práce jsme se zaměřili na otázku zda lysozomální biogenezi může vyvolat akumulace nanomolárních koncentrací protinádorových léčiv, které mají povahu hydrofobních slabých bází. Tento fenomén byl nedávno publikován (Zhitomirsky & Assaraf, 2015). Autoři této práce předpokládají, že zvýšená akumulace slabých hydrofobních bází může způsobit lysozomální stres (lysozomální alkalizaci), který prostřednictvím aktivace TFEB vede k biogenezi lysozomů. Důvodem pro revizi závěrů jejich práce byly následující skutečnosti: i) autoři práce neprokázali, že nanomolární koncentrace hydrofobních slabých bází skutečně způsobují alkalizaci lysozomů (Zhitomirsky & Assaraf, 2015); ii) lysozomální alkalizace byla v literatuře popsána pro vysoké koncentrace hydrofobních slabých bází (Kazmi et al., 2013; Nadanaciva et al., 2011; Ohkuma & Poole, 1978)

Podobně jako předchozí autoři (Zhitomirsky & Assaraf, 2015) jsme v naší práci použili buněčnou linii A549 a doxorubicin a mitoxantron jakožto studovaná léčiva.

Pro ověření, zda k lysozomální biogenezi skutečně dochází, jsme zvolili tři nezávislé metody: analýzu exprese markerových proteinů, stanovení počtu lysozomů, sekvestrační kapacitu lysozomů. Nejprve jsme analyzovali expresi markerových lysozomálních proteinů LAMP-1, LAMP-2 a ATP6V1B2. Výsledky jednoznačně ukázaly, že u žádného ze sledovaných markerových lysozomálních proteinů nedošlo k signifikantnímu zvýšení exprese po působení MTX (graf 1). Se stejným výsledkem dopadla analýza exprese markerových lysozomálních proteinů po působení DXR (graf 2). Tento výsledek jednoznačně ukazuje, že ani MTX, ani DXR neindukují lysozomální biogenezi.



Naproti tomu, dvě zbývající metody ukázaly přesný opak. Imunohistochemické barvení lysozomů ukázalo, že ovlivněné buňky MTX i DXR mají signifikantně zvýšený počet lysozomů v buňce ve srovnání s neovlivněnými buňkami (Graf 3 a 4). U buněk ovlivněných MTX byl počet lysozomů navýšen 1,8krát oproti kontrolním buňkám, kdy u ovlivněných buněk se nacházelo průměrně  $360,8 \pm 108,2$  lysozomů na jednu buňku a u buněk kontrolních se nacházelo průměrně  $195,8 \pm 48,9$  lysozomů na jednu buňku. Podobný nárůst lysozomů byl pozorován u buněk ovlivněných DXR, kdy došlo k 1,9násobnému navýšení množství těchto organel, kdy se u ovlivněných buněk nacházelo průměrně  $245,0 \pm 73,5$  lysozomů na jednu buňku a u buněk kontrolních se nacházelo  $128,6 \pm 32,2$  lysozomů na jednu buňku. Toto naše zjištění odpovídalo výsledkům, které publikovali Zhitomirsky a Assaraf roku 2015.

Podobně analýza akumulací kapacity lysozomů pro imatinib ukázala její signifikantní nárůst, a to jak po působení MTX (Graf 5), tak i po působení DXR (Graf 6). Výsledky druhých dvou metod by naopak bylo možno interpretovat jako důkaz lysozomální biogeneze. Tento závěr nám ovšem neumožňuje udělat zdánlivě protichůdný výsledek analýzy exprese lysozomálních markerových proteinů (Graf 1 a 2). Vzhledem k těmto skutečnostem jsme se rozhodli zjistit, jak jinak, než lysozomální biogenezi, lze získané výsledky interpretovat. Přestože studovaná protinádorová léčiva působí na nádorové buňky širokým spektrem účinků, mají jednu společnou vlastnost, a to účinek na buněčný cyklus. Proto jsme se rozhodli ovlivněné buňky podrobit jeho analýze. Podobně jako jiní autoři (Augustin, Wheatley, Lamb, & Konopa, 1996; Potter & Rabinovitch, 2005) jsme díky analýze buněčného cyklu pozorovali, že MTX a DRX indukují blok v G2/M fázi buněčného cyklu (Graf 7 a 8). U buněk ovlivněných MTX jsme pozorovali blok v G2/M fázi u 38,5 % buněčné populace a u kontrolních buněk jsme pozorovali blok v G2/M pouze u 7,1 % buněčné populace. Po ovlivnění DXR se v bloku G2/M buněčného cyklu nacházelo 73,3 % buněčné populace a u kontrolních buněk došlo k bloku v G2/M fázi pouze u 12,1 % buněčné populace.

Toto je obzvláště důležité zjištění pro naši interpretaci výsledků. Nemělo by být žádným překvapením, že k lysozomální biogenezi dochází během buněčného cyklu, kdy se mateřská buňka připravuje na rozdělení na dvě dceřiné buňky. Regulace lysozomální biogeneze během buněčného cyklu byla nedávno elegantně popsána

v článku CDK4/6 regulate lysosome biogenesis through TFEB/TFE3, Yin et al., 2020. Autoři jasně ukázali přímou souvislost mezi sníženou aktivitou cyklin-dependentních kinas 4 a 6 (CDK4/6) a zvýšenou aktivitou TFEB a TFE3, což vede k lysozomální biogenezi (Yin et al., 2020). Zjištění, že k lysozomální biogenezi dochází během buněčného cyklu, nám umožňuje interpretovat naše výsledky bez vnitřních rozporů. Blok G2/M, který je indukován studovanými látkami, skutečně vede k významnému zvýšení počtu buněk připravených k dělení, tj. buněk, které prošly lysozomální biogenezí. Lysozomální biogenezi lze proto detekovat pouze metodami, jejichž výsledky jsou normalizovány na počet buněk a ne na množství proteinu (srovnej Graf 1 s Grafem 3B). Aktivace TFEB, která byla pozorována v souvislosti s nanomolární koncentrací MTX a DRX a která byla přičítána lysozomální alkalizaci (Zhitomirsky & Assaraf, 2015), pravděpodobně souvisí se změnou buněčného cyklu (Yin et al., 2020).

## 6 Závěr

1. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma:  
a) nádorová buňka a její charakteristické vlastnosti; b) mechanismy mnohočetné lékové rezistence; c) lysozomy a léková rezistence; d) vlastnosti vybraných protinádorových léčiv.
2. V rámci experimentální části jsme zjišťovali, zda lysozomální sekvestrace doxorubicinu a mitoxantronu v nanomolárních koncentracích může indikovat jejich biogenezi pomocí tří nezávislých metod.
  - a) Analýza exprese lysozomálních proteinů LAMP1, LAMP2 a ATP6V1B2 u buněk ovlivněných DXR nebo MTX neukázala její signifikantní nárůst.
  - b) Naproti tomu přímé pozorování lysozomů pomocí imunohistochemického barvení ukázalo signifikantní zvýšení počtu lysozomů u ovlivněných buněk.
  - c) Podobně analýza sekvestrační kapacity lysozomů ukázala její signifikantní nárůst.

Protože použité metody neukázaly jednoznačně, že by k lysozomální biogenezi docházelo, hledali jsme jiné nerozporuplné vysvětlení našich výsledků.
3. Byla provedena analýza buněčného cyklu ovlivněných buněk, která ukázala, že obě studované látky způsobují masivní blok v G2/M fázi.
4. Akumulace buněk v G2/M fázi buněčného cyklu vede k signifikantnímu navýšení počtu buněk v populaci, které jsou připraveny k mitóze s odpovídajícím nárůstem velikosti všech organel včetně lysozomů. Tato změna může být mylně interpretována jako lysozomální biogeneze v důsledku sekvestrace nanomolárních koncentrací DXR a MTX lysozomů.

## 7 Seznam použité literatury

- Aaronson, S. A. (1991). Growth factors and cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5035), 1146–1153. <https://doi.org/10.1126/science.1659742>
- Alvarez, M. G., & Besa, P. C. (2000). Molecular basis of cancer and clinical applications. *Surgical Clinics of North America*, 80(2), 443–457. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70194-8](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70194-8)
- Andrejewski, N., Punnonen, E. L., Guhde, G., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., ... Saftig, P. (1999). Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12692–12701. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12692>
- Arora, A., & Scholar, E. M. (2005). Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(3), 971–979. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084145>
- Augustin, E., Wheatley, D. N., Lamb, J., & Konopa, J. (1996). Imidazoacridinones arrest cell-cycle progression in the G2 phase of L1210 cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 38(1), 39–44. <https://doi.org/10.1007/s002800050445>
- Bainton, D. F. (1981). The discovery of lysosomes. *The Journal of Cell Biology*, 91(3 Pt 2), 66s–76s. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.66s>
- Bajaj, L., Lotfi, P., Pal, R., Ronza, A. di, Sharma, J., & Sardiello, M. (2019). Lysosome biogenesis in health and disease. *Journal of Neurochemistry*, 148(5), 573–589. <https://doi.org/10.1111/jnc.14564>
- Baldo, B. A., & Pham, N. H. (2013). Adverse reactions to targeted and non-targeted chemotherapeutic drugs with emphasis on hypersensitivity responses and the invasive metastatic switch. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3–4), 723–761. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9447-3>
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Baudino, T. A. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(1), 3–20. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150602144310>
- Bishop, J. M. (1988). The molecular genetics of cancer: 1988. *Leukemia*, 2(4), 199–208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3283469>
- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64(2), 235–248. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90636-d](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90636-d)
- Bowers, W. E. (1998). Christian de Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes. *Trends in Cell Biology*, 8(8), 330–333. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(98\)01314-2](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01314-2)
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3(SUPPL. 3), 4–10. <https://doi.org/10.1159/000088478>
- Carvalho, C., Santos, R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P., Santos, M., & Moreira, P. (2009). Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*, 16(25), 3267–3285. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>
- Conus, S., & Simon, H.-U. (2008). Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochemical Pharmacology*, 76(11), 1374–1382. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.041>
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., & Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, 60(4), 604–617. <https://doi.org/10.1042/bj0600604>

- De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annual Review of Physiology*, 28(1), 435–492. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.28.030166.002251>
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, 104(6), 1129–1137. <https://doi.org/10.1002/cncr.21324>
- Eskelinen, E.-L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(5–6), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.08.005>
- Eskelinen, E.-L., Cuervo, A. M., Taylor, M. R. G., Nishino, I., Blum, J. S., Dice, J. F., ... Saftig, P. (2005). Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(11), 1058–1061. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00337.x>
- Eskelinen, E.-L., Illert, A. L., Tanaka, Y., Schwarzmann, G., Blanz, J., von Figura, K., & Saftig, P. (2002). Role of LAMP-2 in Lysosome Biogenesis and Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 13(9), 3355–3368. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0114>
- Eskelinen, E.-L., Tanaka, Y., & Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in Cell Biology*, 13(3), 137–145. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(03\)00005-9](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(03)00005-9)
- Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1317–1322. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1317>
- Febbraio, M., & Silverstein, R. L. (1990). Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(30), 18531–18537. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)44784-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)44784-3)
- Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*, 23(12), 620–633. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006>
- Finley, R. S. (2003). Overview of targeted therapies for cancer. *American Journal of Health-System Pharmacy : AJHP : Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 60(24 Suppl 9), S4-10. [https://doi.org/10.1093/ajhp/60.suppl\\_9.S4](https://doi.org/10.1093/ajhp/60.suppl_9.S4)
- Fukuda, M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 21327–21330. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)54636-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)54636-6)
- Geiger, T. R., & Peeper, D. S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1796(2), 293–308. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.07.006>
- Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician*, 77(3), 311–319. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18297955>
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews. Cancer*, 2(1), 48–58. <https://doi.org/10.1038/nrc706>
- Halaby, R. (2019). Influence of lysosomal sequestration on multidrug resistance in cancer cells. *Cancer Drug Resistance*, 2(1), 31–42. <https://doi.org/10.20517/cdr.2018.23>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hinton, A., Bond, S., & Forgac, M. (2009). V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 457(3), 589–598. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0382-4>

- Hraběta, J., Belhajová, M., Šubrtová, H., Merlos Rodrigo, M. A., Heger, Z., & Eckschlager, T. (2020). Drug Sequestration in Lysosomes as One of the Mechanisms of Chemoresistance of Cancer Cells and the Possibilities of Its Inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21124392>
- Hunziker, W., Simmen, T., & Höning, S. (1996). Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells. *Nephrologie*, 17(7), 347–350. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8987042>
- Kaufmann, A. M., & Krise, J. P. (2007). Lysosomal Sequestration of Amine-Containing Drugs: Analysis and Therapeutic Implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(4), 729–746. <https://doi.org/10.1002/jps.20792>
- Kazmi, F., Hensley, T., Pope, C., Funk, R. S., Loewen, G. J., Buckley, D. B., & Parkinson, A. (2013). Lysosomal sequestration (trapping) of lipophilic amine (cationic amphiphilic) drugs in immortalized human hepatocytes (Fa2N-4 cells). *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 41(4), 897–905. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.050054>
- Kornfeld, S., & Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annual Review of Cell Biology*, 5(1), 483–525. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.05.110189.002411>
- Korsmeyer, Stanley J. (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Research*, 59(7 SUPPL.), 1693–1701. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(96\)85244-7](https://doi.org/10.1016/0165-4608(96)85244-7)
- Krishna, R., & Mayer, L. D. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00114-7)
- Larsen, A. K., Escargueil, A. E., & Skladanowski, A. (2000). Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 85(3), 217–229. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(99\)00073-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(99)00073-x)
- Lee, N., Wang, W. C., & Fukuda, M. (1990). Granulocytic differentiation of HL-60 cells is associated with increase of poly-N-acetylactosamine in Asn-linked oligosaccharides attached to human lysosomal membrane glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20476–20487. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)30529-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)30529-x)
- Lind, M. J. (2008). Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine*, 36(1), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2007.10.003>
- Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T., & Housman, D. E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 74(6), 957–967. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90719-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90719-7)
- Madhusudan, S., & Ganesan, T. S. (2004). Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry*, 37(7), 618–635. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.05.006>
- Malhotra, V., & Perry, M. C. (2003). Classical Chemotherapy: Mechanisms, Toxicities and the Therapeutic Window. *Cancer Biology & Therapy*, 2(sup1), 1–3. <https://doi.org/10.4161/cbt.199>
- Martin, A., & Sarkar, A. (2017). Overview on biological implications of metal oxide nanoparticle exposure to human alveolar A549 cell line. *Nanotoxicology*, 11(6), 713–724. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1366574>
- Martin, L. P., Hamilton, T. C., & Schilder, R. J. (2008). Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1291–1295. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2238>

- Merlos Rodrigo, M. A., Jimenez Jimenez, A. M., Haddad, Y., Bodoor, K., Adam, P., Krizkova, S., ... Adam, V. (2020). Metallothionein isoforms as double agents - Their roles in carcinogenesis, cancer progression and chemoresistance. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 52(March), 100691. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2020.100691>
- Mullins, C., & Bonifacino, J. S. (2001). The molecular machinery for lysosome biogenesis. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 23(4), 333–343. <https://doi.org/10.1002/bies.1048>
- Murphy, R. F. (1991). Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends in Cell Biology*, 1(4), 77–82. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(91\)90022-2](https://doi.org/10.1016/0962-8924(91)90022-2)
- Nadanaciva, S., Lu, S., Gebhard, D. F., Jessen, B. A., Pennie, W. D., & Will, Y. (2011). A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 25(3), 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.12.010>
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213–219. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>
- Novikov, N. M. (2020). Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*, (October), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01149-0>
- Ohkuma, S., & Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(7), 3327–3331. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.7.3327>
- Pai, R., Szabo, I. L., Kawanaka, H., Soreghan, B. A., Jones, M. K., & Tarnawski, A. S. (2000). Indomethacin inhibits endothelial cell proliferation by suppressing cell cycle proteins and PRB phosphorylation: a key to its antiangiogenic action? *Molecular Cell Biology Research Communications : MCBRC*, 4(2), 111–116. <https://doi.org/10.1006/mcbr.2000.0260>
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., & Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human Molecular Genetics*, 20(19), 3852–3866. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr306>
- Pawson, T. (2002). Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 38 Suppl 5, S3-10. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(02\)80597-4](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)80597-4)
- Peña-Llopis, S., Vega-Rubin-de-Celis, S., Schwartz, J. C., Wolff, N. C., Tran, T. A. T., Zou, L., ... Brugarolas, J. (2011). Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *The EMBO Journal*, 30(16), 3242–3258. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.257>
- Potter, A. J., & Rabinovitch, P. S. (2005). The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutation Research*, 572(1–2), 27–44. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.11.018>
- Ramos, P., & Bentires-Alj, M. (2015). Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene*, 34(28), 3617–3626. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.314>
- Ruzickova, E., Skoupa, N., Dolezel, P., Smith, D. A., & Mlejnek, P. (2019). The Lysosomal Sequestration of Tyrosine Kinase Inhibitors and Drug Resistance. *Biomolecules*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110675>
- Sabatini, D. D., & Adesnik, M. (2013). Christian de Duve: Explorer of the cell who discovered new organelles by using a centrifuge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), 13234–13235. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312084110>

- Saftig, P., Beertsen, W., & Eskelinen, E. L. (2008). LAMP-2: A control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*, 4(4), 510–512. <https://doi.org/10.4161/auto.5724>
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., ... Ballabio, A. (2009). A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science*, 325(5939), 473–477. <https://doi.org/10.1126/science.1174447>
- Schirmmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 54(2), 407–419. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>
- Schuster, M., Nechansky, A., & Kircheis, R. (2006). Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal*, 1(2), 138–147. <https://doi.org/10.1002/biot.200500044>
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., ... Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal*, 31(5), 1095–1108. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.32>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Skoupa, N., Dolezel, P., & Mlejnek, P. (2020). Lysosomal Fusion: An Efficient Mechanism Increasing Their Sequestration Capacity for Weak Base Drugs without Apparent Lysosomal Biogenesis. *Biomolecules*, 10(1), 1–37. <https://doi.org/10.3390/biom10010077>
- Storrie, B., & Desjardins, M. (1996). The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 18(11), 895–903. <https://doi.org/10.1002/bies.950181108>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Turk, B., & Turk, V. (2009). Lysosomes as “suicide bags” in cell death: myth or reality? *The Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 21783–21787. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.023820>
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)
- Wiseman, L. R., & Spencer, C. M. (1997). Mitoxantrone. A review of its pharmacology and clinical efficacy in the management of hormone-resistant advanced prostate cancer. *Drugs & Aging*, 10(6), 473–485. <https://doi.org/10.2165/00002512-199710060-00007>
- Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., & Shay, J. W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 9(7), 3088–3092. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.7.3088>
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68(C), 251–306. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62312-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62312-8)
- Yin, Q., Jian, Y., Xu, M., Huang, X., Wang, N., Liu, Z., ... Yang, C. (2020). CDK4/6 regulate lysosome biogenesis through TFEB/TFE3. *The Journal of Cell Biology*, 219(8). <https://doi.org/10.1083/jcb.201911036>
- Zheng, H.-C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950–59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>
- Zhitomirsky, B., & Assaraf, Y. G. (2015). Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base



chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance. *Oncotarget*, 6(2), 1143–1156.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2732>

Zhitomirsky, B., & Assaraf, Y. G. (2017). Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis. *Oncotarget*, 8(28), 45117–45132.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15155>