

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Hedgehog signální dráha ve vztahu k duktálnímu  
adenokarcinomu pankreatu**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	Barbara Duchoňová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	MUDr. Beatrice Mohelníková-Duchoňová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2015

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Barbara Duchoňová
Název práce	Hedgehog signální dráha ve vztahu k duktálnímu adenokarcinomu pankreatu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci Onkologická klinika
Vedoucí práce	MUDr. Beatrice Mohelníková-Duchoňová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

## **Abstrakt**

Duktální adenokarcinom pankreatu (PDAC) je nejčastějším zhoubným nádorem slinivky břišní. Toto nádorové onemocnění má velmi špatnou prognózu, obtížnou léčbu a v současnosti je uváděn jako čtvrtá nejčastější příčina úmrtí na nádorové onemocnění v České republice. Klíčovým faktorem špatné prognózy je zejména pozdní diagnostika PDAC, jelikož počáteční stádia se nijak specificky neprojevují.

Bakalářská práce je zaměřena na studium exprese klíčových genů Hedgehog (HH) signální dráhy. HH signální dráha je stěžejní pro diferenciaci tkání během embryonálního vývoje lidského organismu a k její aktivaci dochází i během patogeneze nádorových onemocnění. V dospělosti je tato dráha neaktivní.

Konkrétně bylo studium prováděno u vzorků PDAC tří odlišných buněčných linií, jmenovitě BxPC-3, PaCa-44, a MIA PaCa-2, dále u chemonaivních xenograftů a xenograftů léčených cytostatiky (taxany - Stony Brook Taxan SBT-1214, SBT-1216). Alterace exprese genů byla měřena pomocí qPCR a vyhodnocena  $\Delta\Delta CT$  metodou.

Klíčová slova	Duktální adenokarcinom pankreatu (PDAC), Hedgehog (HH) signální dráha, exprese genu
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name	
and surname	Barbara Duchoňová
Title of thesis	The role of Hedgehog signalling pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Oncology Faculty of Medicine and Dentistry Palacký University Olomouc
Supervisor	MUDr. Beatrice Mohelníková-Duchoňová, Ph.D.
The year of presentation	2015

## **Abstract**

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common malignant pancreatic cancer. This disease has very bad prognosis, difficult treatment and currently is reported as the fourth most common cause of death by cancer in the Czech Republic. The key factor of bad prognosis is especially late diagnosis of PDAC, because the initial stages are not specifically reflected.

Bachelor thesis is focused on the study of the expression of key genes Hedgehog signalling pathway. HH signalling pathway is crucial for tissue differentiation during embryonic development of the human body and to activate it occurs during the pathogenesis of cancer. In adulthood, this track is inactive.

Specifically, the study was carried out at PDAC samples of three different cell lines, namely BxPC-3, Paca-44, a MiaPaCa-2, further at chemo-naive xenografts and xenografts treated with cytostatics (taxanes - Stony Brook Taxan SBT-1214, SBT-1216). Alteration of gene expression was measured by PCR and evaluated by  $\Delta\Delta CT$  method.

Keywords	Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), Hedgehog (HH) signalling pathway, gene expression
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne

Touto cestou bych chtěla poděkovat mé vedoucí Mudr. Beatrici Mohelníkové-Duchoňové, Ph.D. za poskytnutí výborných podmínek pro zpracování bakalářské práce, za všechny obětovaný čas, cenné připomínky, rady a poskytnuté materiály. Mé poděkování patří také pracovníkům Oddělení toxikogenomiky v Praze, kde jsem měla možnost provádět svůj výzkum a pracovníkům katedry Laboratoře růstových regulátorů za jejich ochotu a vstřícnost. V neposlední řadě děkuji své rodině, jejíž podpora mne doprovázela po celou dobu studia.

## **OBSAH**

ABECEDNÍ SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	8
TEORETICKÁ ČÁST .....	11
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....	12
2 DUKTÁLNÍ ADENOKARCINOM PANKREATU .....	13
3 HEDGEHOG SIGNÁLNÍ DRÁHA .....	15
3.1 Jednotlivé komponenty HH signální dráhy .....	15
3.2 Průběh signální dráhy .....	19
3.2.1 Bez navázaného ligandu .....	20
3.2.2 S navázaným ligandem .....	20
3.3 Role SHH u karcinomu pankreatu .....	22
PRAKTICKÁ ČÁST .....	24
4 MATERIÁL A METODY .....	25
4.1 Biologický materiál .....	25
4.1.1 Použité buněčné kultury .....	25
4.1.2 Použité xenografty .....	26
4.2 Kontrola integrity a kvantity RNA .....	27
4.2.1 Přístroje .....	27
4.2.2 Kit .....	27
4.2.3 Pracovní postup .....	27
4.3 Syntéza cDNA .....	27
4.3.1 Přístroje .....	28
4.3.2 Kit .....	28
4.3.3 Pracovní postup .....	28
4.4 Kontrola produktů cDNA .....	29
4.4.1 Chemikálie .....	29
4.4.2 Přístroje .....	29
4.4.3 Pracovní postup .....	29

4.5	Relativní kvantifikace míry exprese genů pomocí real-time PCR.....	30
4.5.1	Chemikálie .....	30
4.5.2	Přístroje .....	30
4.5.3	Pracovní postup.....	30
4.5.4	Analýza míry exprese referenčních genů .....	33
5	VÝSLEDKY .....	34
5.1	Buněčné linie a xenografty .....	34
5.2	Srovnání exprese HH signální dráhy parentálních buněčných linií .....	34
5.3	Rozdíly v expresi xenograftů jednotlivých tří buněčných linií .....	37
5.4	Srovnání vzorků linie PaCa-44 léčených SBT a neléčených .....	40
6	DISKUZE .....	43
7	ZÁVĚR.....	45
	POUŽITÁ LITERATURA.....	46
	INTERNETOVÉ ZDROJE .....	53

## ABECEDNÍ SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ARRB1	Arrestin beta 1 (OMIM: 107940)
ARRB2	Arrestin beta 2 (OMIM: 107941)
BMI	Body mass index
BTRC	Beta-transducin repeat-containing protein (OMIM: 603482)
cDNA	Complementary DNA
CI	95% interval spolehlivosti
CT	Počet cyklů
C-SHH	C-terminální protein SHH
CDKN2A/p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (OMIM: 600160)
CSNK1A1	Casein kinase I $\alpha$ (OMIM: 600505)
DHH	Desert hedgehog (OMIM: 605423)
F-box proteiny	E3 ubiquitin ligázy
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
GAS1	Growth arrest-specific 1 (OMIM: 139185)
GLI1	Glioma-associated oncogene 1 (OMIM: 165220)
GLI2	Gli-kruppel family member 2 (OMIM: 165230)
GLI3	Gli-kruppel family member 3 (OMIM: 165240)
GLI <sup>A</sup>	Aktivní forma GLI
GLI <sup>R</sup>	Represorová forma GLI
GNAI1	Guanine nucleotide-binding protein, $\alpha$ -inhibiting activity polypeptide 1 (OMIM: 139310)
GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein, $\alpha$ -inhibiting activity polypeptide 2 (OMIM: 139360)
GNAI3	Guanine nucleotide-binding protein, $\alpha$ -inhibiting activity polypeptide 3 (OMIM: 139370)
GSK3A	Glycogen synthase kinase 3- $\alpha$ (OMIM: 606784)
GSK3B	Glycogen synthase kinase 3- $\beta$ (OMIM: 605004)
HHAT	Hedgehog acetyltransferase (OMIM: 605743)
HHIP	Hedgehog-interacting protein (OMIM: 606178)
Hh	Hedgehog gen <i>Drosophila melanogaster</i>
HH	Savčí gen hedgehog
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ (OMIM: 603348)



IHH	Indian hedgehog (OMIM: 600726)
KCTD11	Potassium channel tetramerization domain-containing protein 11 (OMIM: 609848)
KIF3A	Kinesin family member 3A (OMIM: 604683)
KIF7	Kinesin family member 7 (OMIM: 611254)
KRAS	V-KI-RAS2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (OMIM: 190070)
LRP2	Low density lipoprotein receptor-related protein 2 (OMIM: 600073)
NCT	Negativní kontrola
N-SHH	N-terminální protein SHH
PANIN	Pankreatická intraduktální neoplazie - prekancerózní léze
PCR	Polymerázová řetězová reakce
qPCR	Kvantitativní real-time PCR
PDAC	Duktální adenokarcinom pankreatu
PKA	cAMP-dependentní proteinkinasy
PRKACA	Protein kinase cAMP-dependent catalytic $\alpha$ (OMIM: 601639)
PRKACB	Protein kinase cAMP-dependent catalytic $\beta$ (OMIM: 176892)
PRKACG	Protein kinase cAMP-dependent catalytic $\gamma$ (OMIM: 176893)
PRKAR1A	Protein kinase cAMP-dependent regulatory, type I $\alpha$ (OMIM: 188830)
PRKAR1B	Protein kinase cAMP-dependent regulatory, type I $\beta$ (OMIM: 176911)
PRKAR2A	Protein kinase cAMP-dependent regulatory, type II $\alpha$ (OMIM: 176910)
PRKAR2B	Protein kinase cAMP-dependent regulatory, type II $\beta$ (OMIM: 176912)
PTCH1	Patched homolog 1 (OMIM: 601309)
PTCH2	Patched homolog 2 (OMIM: 603673)
RIN	RNA integrity number
SBT	Stony Brook Taxane
SHH	Sonic hedgehog (OMIM: 600725)
SMAD4/DPC4	SMAD family member 4 (OMIM: 600993)
SMO	Smoothed homolog (OMIM: 601500)

STK36	Serine/threonine protein kinase 36 (OMIM: 607652)
SUFU	Supressor of fused homolog (OMIM: 607035)
SUFU-GLI	Komplex SUFU a GLI
TP53	Tumor protein p53 (OMIM: 191170)
UBC	Ubiquitin C
VEGF	Vascular endothelial growth factor A (OMIM: 192240)
WT	Wild type (standardní typ)

## **TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této práce je vypracování literární rešerše současného poznání v oblasti adenokarcinomu pankreatu a signální dráhy Hedgehog (HH). Vzhledem k tématu práce je tato část zaměřena na epidemiologii karcinomu pankreatu, jeho incidenci, mortalitu a současné možnosti léčby. HH signální dráha je klíčová při embryonálním vývoji lidského organismu a k její aktivaci dochází také během patogeneze nádorových onemocnění. Teoretická část práce shrnuje informace o HH signální dráze, jednotlivých proteinech účastnících se přenosu signálu, se zaměřením na úlohu v karcinogenezi a progresi karcinomu pankreatu. Dále také na potenciální možnosti jejího ovlivnění v cílené terapii.

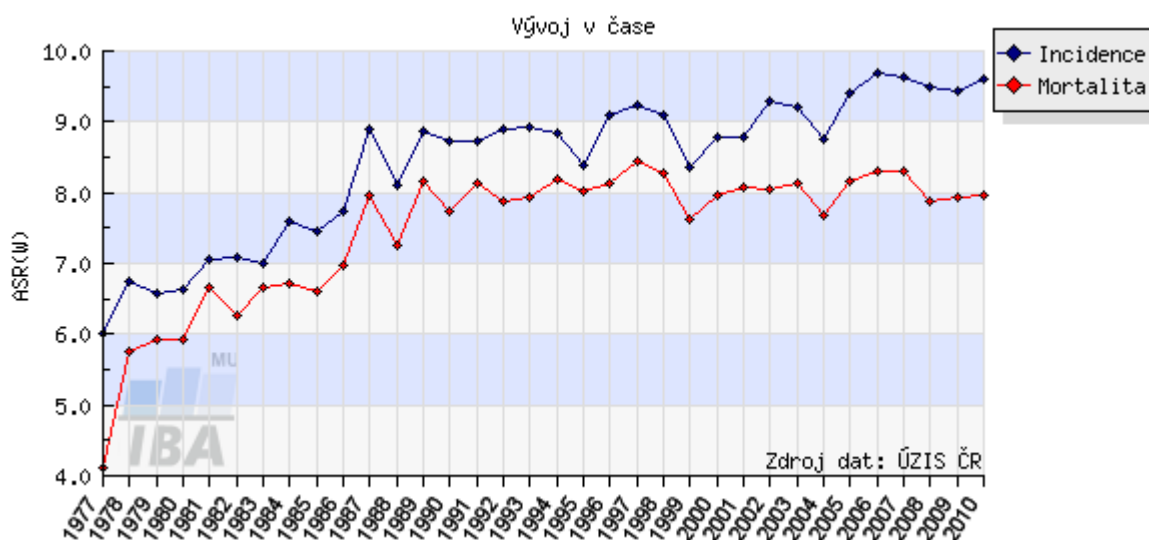
V druhé části, která je prakticky zaměřená, je cílem podrobné studium exprese signální dráhy HH v nádorových buňkách pankreatu u buněčných linií a jejího ovlivnění podáním cytostatik (taxanů) modelovým nádorovým xenograftům *in vivo*. Alterace exprese genů HH signální dráhy v duktálním adenokarcinomu pankreatu (PDAC) má zásadní roli pro patogenezi tohoto onemocnění, nicméně přesný mechanismus, kterým se na karcinogenezi a progresi PDAC podílí, není doposud zcela objasněn. PDAC se vyznačuje značnou hypovaskularizací a výrazným okolním vazivovým stromatem. Nádorové buňky exprimují HH ligandy, kterými komunikují s okolním vazivovým stromatem, díky čemuž dochází k následnému nádorovému růstu a angiogenezi. Mezi dalšími popsány mechanismy, kterými se HH signální dráha podílí na progresi PDAC, je tzv. epiteliální mezenchymální přechod, který může být klíčovým mechanismem šíření nádorových buněk do dalších orgánů pacienta.

Cílem této práce je porovnání expresní hladiny 34 klíčových genů HH signální dráhy mezi jednotlivými buněčnými liniemi, lišícími se jak genetickým profilem, tak i biologickým chováním, agresivitou a přežíváním, a dále mezi parenterálními buněčnými liniemi a nádory neléčených i léčených xenograftů. Pochopení významu HH signální dráhy na průběh PDAC může otevřít nové léčebné možnosti pro nemocné pacienty. Zároveň je tato práce pilotním projektem k následné analýze genů HH signální dráhy jako potenciálních prognostických biomarkerů u pacientů s PDAC, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon.

## 2 DUKTÁLNÍ ADENOKARCINOM PANKREATU

Duktální adenokarcinom pankreatu (PDAC; MKN-10: C.25), nejčastější zhoubný nádor slinivky břišní, je nádorové onemocnění s velmi špatnou prognózou a obtížnou léčbou (Jemal et al., 2010). PDAC je v současnosti uváděn jako čtvrtá nejčastější příčina úmrtí na nádorové onemocnění v České republice, a to hned po rakovině plic, prostaty, rakovině tlustého střeva a konečníku u mužů. U žen pak po rakovině plic, prsu a taktéž rakovině tlustého střeva a konečníku.

Pro naprostou většinu pacientů je toto onemocnění, i přes moderní onkologickou léčbu, smrtelné (Li et al., 2004). Ročně je v České republice nově diagnostikováno zhruba 1900 pacientů s PDAC, přičemž v roce 2010 na tuto diagnózu zemřelo 971 nemocných mužů a 910 žen (ÚZIS - Novotvary 2007, 2010). Incidence PDAC ročně mírně stoupá, úmrtnost zůstává do značné míry stejná (Obr. 1). Nejvíce pacientů postižených PDAC je ve věkovém rozmezí sedmdesáti až osmdesáti let (Jemal et al., 2010).



**Obr. 1** Incidence a mortalita karcinomu pankreatu v ČR od roku 1977 do roku 2010

*Legenda:* Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob – modrá křivka) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob – červená křivka) pro zvolenou diagnózu C.25 v celé populaci. Zdroj: <http://www.svod.cz>.

Mezi rizikové faktory pro rozvoj PDAC můžeme zařadit věk, mužské pohlaví, kouření, nadměrný příjem tuků, nedostatek ovoce a zeleniny ve stravě (Li et al., 2004), a vysoký BMI index (Li et al., 2009). Dále pak práci s chemikáliemi, jako je  $\beta$ -naftylamin a benzidin (Mancuso a el-Attar, 1967). U jedinců, kteří prodělali za svůj život chronickou pankreatitidu, je riziko výskytu adenokarcinomu slinivky taktéž vyšší (Bracci et al., 2009).

Klíčovým faktorem špatné prognózy je zejména pozdní diagnostika PDAC, jelikož počáteční stádia se nijak specificky neprojeví. Mezi typické příznaky pozdějších stádií patří bolest břicha, hromadění tekutiny v břišní dutině, nechutenství, nevolnost s nutkáním

ke zvracení a úbytek na váze. Tuto pozdní fázi onemocnění již obvykle lékaři nejsou schopni chirurgicky léčit. V současné době je chirurgická resekce, tedy radikální operativní odstranění tumoru, v kombinaci s chemoterapií jedinou potenciálně kurativní terapií PDAC (Li et al., 2004). Bohužel pouze 15-20% pacientů získá díky tomuto zákroku dalších zhruba 5 let života. Pro zbytek pacientů je medián přežití pouhých 16 měsíců (Loveček et al., 2010).

Chirurgická léčba může být kombinována s adjuvantní a neoadjuvantní léčbou. Neoadjuvantní terapie je léčbou předoperační, jejímž cílem je zvýšit pravděpodobnost úspěchu operace (Quiros et al., 2007). Adjuvantní terapie je naopak léčba pooperační, která se provádí z důvodu snížení rizika statisticky prokázaného návratu onemocnění (Yeo et al., 1997). U zotavených pacientů se s adjuvantní terapií začíná 4 až 8 týdnů po operaci. Tato léčba je obvykle podávána v šesti cyklech na bázi gemcitabinu či 5-fluorouracilu, nově jsou také podávány režimy FOLFIRINOX a nab-paklitaxel (Conroy et al., 2011).

Často používanou léčbou je také chemoterapie paliativní (záchranná). Ta je cílená pro pacienty, u kterých dochází k návratu onemocnění nebo je onemocnění již v době diagnózy ve stádiu se systémovým rozšířením po těle. Cílem paliativní onkologické léčby je zmírnit příznaky nemoci, zkvalitnit život a prodloužit celkové přežití (House a Choti, 2005).

Pacienti s lokálně pokročilým i s metastazujícím onemocněním jsou při léčbě závislí na svém celkovém zdravotním stavu. U pacientů, kde již není možné použít léčbu onkologickou, chemoterapii či radioterapii, je prováděna tzv. symptomatická terapie, která neodstraňuje příčinu onemocnění, ale do jisté míry zmírňuje příznaky jako silnou bolest, žlučovou či žaludeční neprůchodnost a další projevy pokročilého onemocnění (Hucl, 2012).

V popředí současného výzkumu je cílená (biologická) léčba, kterou lze definovat jako negenotoxickou protinádorovou léčbu. Jejím cílem je ovlivnění signálních kaskád klíčových pro přežití a proliferaci nádorových buněk a nádorovou angiogenezi. V posledním desetiletí se cílená terapie stále více uplatňuje v léčbě širokého spektra solidních nádorů, ale doposud zcela selhává u PDAC. Medián přežívání pacientů s karcinomem pankreatu v současné době není vyšší než 6 měsíců a existuje jen málo pacientů s PDAC, kteří byli zcela vyléčeni (Halámková et al., 2010). Proto je velice důležité zabývat se vznikem zhoubného bujení a sledovat jeho vývoj pro lepší pochopení celého procesu a tvorbu nových účinných léků.

### 3 HEDGEHOG SIGNÁLNÍ DRÁHA

Signální dráha Hedgehog patří ke klíčovým regulátorům vývoje organismů a byla poprvé popsána již roku 1980 při hledání genů, které ovlivňují fenotyp octomilky rodu *Drosophila* (Nusslein-Volhard a Wieschaus, 1980). Vzniklý fenotyp byl charakteristický ostnatými útvary na povrchu těla a vzhledově tak připomínal ježka, z čehož vyplývá také anglický název Hedgehog. Jméno samotné dráhy je odvozeno od patrně nejdůležitějšího intracelulárního signálního polypeptidu Hedgehog (Hh), který se váže na receptory buňky a je zodpovědný za následnou proliferaci.

Později byla tato signální dráha popsána i u dalších živočichů včetně člověka (Ingham, 2008), kde se významně podílí na řadě procesů, primárně ve fázi embryonálního vývoje, jako je např. správné vytvarování prstů, růst a vývoj kostí apod. Naopak v období dospělosti je u lidí Hedgehog (HH) signální dráha v naprosté většině tkání neaktivní s výjimkou tkáně nádorové a několika dalších jako jsou např. buňky vlasových folikulů (Mill et al., 2003).

Vliv Hedgehog signální dráhy na vznik nádorů byl poprvé popsán u pacientů s Gorlinovým syndromem (Johnson et al., 1996). Toto vzácné hereditární onemocnění s autosomálně dominantní dědičností má typické příznaky, mezi které patří mnohočetné bazaliomy, fibromy, hydrocephalus a charakteristické malformace skeletu (Rubin a de Sauvage, 2006). Za onemocnění jsou zodpovědné mutace genu Patched homolog 1 (*PTCH1*), který nalezneme na 9. chromosomu. Mutace dále způsobuje nekontrolovatelné dělení buněk, tedy vede ke zvýšenému riziku vzniku nádorů (Zhu et al., 2014). Již je známo, že alterace HH signální dráhy hrají důležitou roli při vzniku řady epitelálních typů rakoviny, včetně karcinomu plic (Yue et al., 2014), slinivky břišní (Onishi a Katano, 2014) a prostaty (Wilkinson et al., 2013).

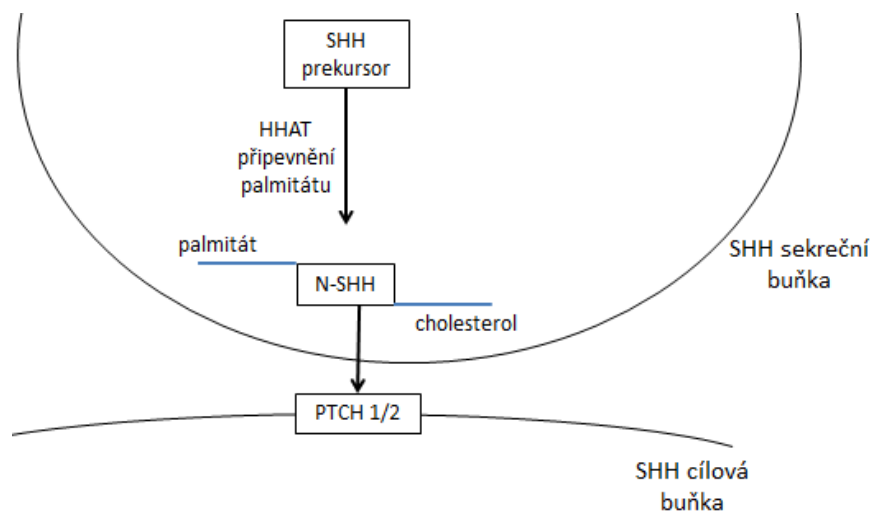
#### 3.1 Jednotlivé komponenty HH signální dráhy

K dnešnímu dni jsou známy tři lidské homology genu Hedgehog (Hh), a to Sonic hedgehog (*SHH*), Desert hedgehog (*DHH*) a Indian hedgehog (*IHH*).

První z homologů, *DHH* je exprimován v Sertoliho buňkách vyvíjejících se varlat a ve Schwannových buňkách periferních nervů. Jeho významná role ve spermatogenezi a vývoji periferních nervů byla *in vivo* prokázána pomocí *DHH*-null myších modelů (Bitgood et al., 1996). *IHH* gen, druhý homolog, reguluje buněčný růst, osifikaci dlouhých kostí a vývoj chrupavky. Též se vyskytuje ve vyvíjejících se plicích a v plně vyvinutých játrech a ledvinách (Maeda et al., 2007). Třetím homologem je gen *SHH*, který je z výše

zmíněných tří genů doposud nejvíce prozkoumán. Krystalová struktura jeho N terminální domény byla stanovena roku 1995 (Hall et al., 1995).

Pro správnou signalizaci dráhy je důležitý protein zvaný Hedgehog acetyltransferasa (HHAT). Tento membránový protein na sebe váže energii ve formě GTP a jeho funkcí je upevnění palmitátu na N-konec SHH (Chamoun et al., 2001) (Obr. 2).



**Obr. 2** Upevnění palmitátu na SHH prekursor pomocí proteinu HHAT

Výše zmíněné HH ligandy (SHH, IHH, DHH) interagují s receptorem Patched homolog 1 (PTCH1), který v buňce působí jako nádorový supresor (Pepinsky et al., 2000). Tento receptor má specifické vazebné místo pro spojení s DHH, IHH i SHH (Theunissen a de Sauvage, 2009). Patched homolog 2 (PTCH2) je membránový protein z 57 % identický s PTCH1 (Rahnama et al., 2004). Slouží také jako receptor pro kterýkoliv ze tří HH ligandů, čímž spouští signální dráhu. Zároveň oba tyto proteiny ve stavu bez ligandů HH dráhu inhibují svou vazbou s proteinem Smoothened (SMO).

Stejně jako PTCH1 a PTCH2 dokáže navázat HH ligandy také Hedgehog-interacting protein (HHIP). Na rozdíl od PTCH1/2 ale pravděpodobně HH dráhu neaktivuje. Předpokládá se, že dokáže regulovat dostupnost ligandů a tlumit tak signál jejich vyvazováním (Chuang a McMahon, 1999).

Low density lipoprotein-related protein 2 (LRP2) je exprimován v mnoha tkáních, zejména v absorpčních epitelových tkáních jako jsou ledviny (Christ et al., 2012). Skládá se z extracelulární a membránové domény a plazmatického konce. Jeho extracelulární protein-vázající doménou je schopen navázat albumin, apolipoprotein B, E a lipoproteinové lipázy. LRP2 je označován jako pomocný vazebný protein SHH, který kontroluje správnou interakci mezi SHH a PTCH1.

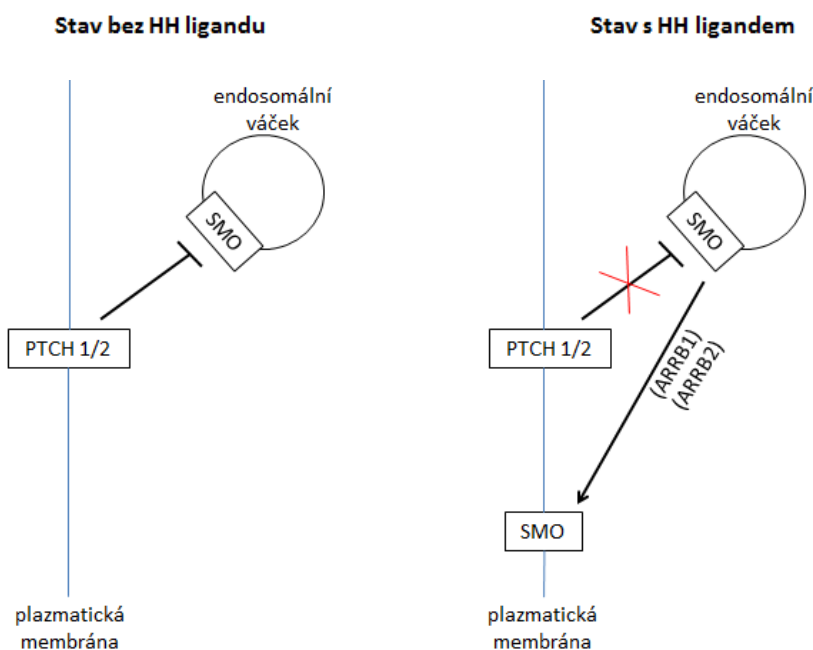


Growth arrest-specific 1 (GAS1) je pozitivním regulátorem HH signalizace (Martinelli a Fan, 2007), má vysokou afinitu k HH ligandům a vzájemně spolupracuje s PTCH1, čímž zvyšuje signalizační činnost při nízkých koncentracích HH ligandu.

Již zmíněný transmembránový protein SMO přenáší signál do cytoplasmy pomocí proteinů vázajících nukleotidy (guanine nucleotide binding proteins - GNAI1, GNAI2, GNAI3) (Ogden et al., 2008). Protein GNAI2 byl nalezen ve své aktivní formě v nádorech žláz s vnitřní sekrecí (Lyons et al., 1990). Bylo dokázáno, že aktivní forma GNAI2 způsobuje rychlejší růst buněk a nádorů (Hermouet et al., 1996).

Casein kinase I  $\alpha$  (CSNK1A1) je protein, který fosforyluje SMO a zvyšuje tím jeho hladinu na povrchu buňky. Díky tomu zvyšuje pravděpodobnost aktivace HH signální dráhy (Jia et al., 2004).

Při spuštění HH dráhy jsou důležité proteiny, které přenáší SMO z endosomálního váčku na povrch buňky (Kovacs et al., 2008). Za tento proces jsou zodpovědné proteiny arrestin beta 1, 2 (ARRB1, 2). Pokud je jich v buňce nedostatek, nemůže přenos proběhnout a nedochází následně k aktivaci dráhy. Geny ARRB1 a 2 jsou tedy důležitými komponentami pro spuštění HH-podmíněné transkripce v jádře buňky (Obr. 3).



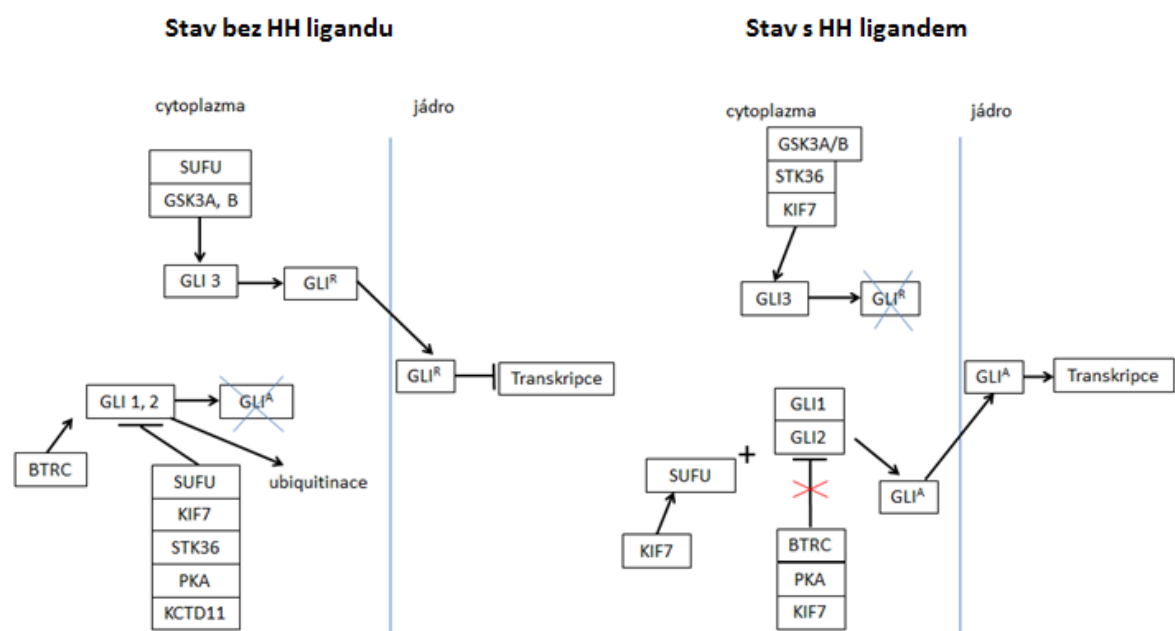
**Obr. 3** Proteinové interakce mezi PTCH1/2 a SMO ve stavu bez HH ligandu a s HH ligandem a SMO transport z endosomálního váčku do plazmatické membrány.

Dalšími důležitými proteiny HH dráhy jsou transkripční faktory GLI1, 2, 3 (glioma-associated oncogene 1, gli-kruppel family member 2 a 3). Všeobecně se GLI proteiny skládají z více než 1000 aminokyselin, které jsou charakteristické svými pěti zinkovými „prsty“, z nichž třemi se vážou k DNA (Ruiz i Altaba, 1999). Funkce GLI transkripčních faktorů v organismu je rozdílná. GLI1 a GLI2 jsou v buňce zodpovědné za

většinu aktivací HH dráhy (Bai a Joyner, 2001). GLI1 gen byl objeven v maligním gliomu, kde byla značně zvýšena jeho exprese (Kinzler et al., 1987). GLI2 je hlavní transkripční faktor, který zprostředkovává HH signalizaci při vývoji kůže, ale také se podílí při vzniku nádorů. Zatímco GLI1 je pro normální vývoj embrya v podstatě zbytečný, bylo prokázáno, že absence GLI2 v buňkách vede k úmrtí novorozenců a skeletárním vadám (Mo et al., 1997). GLI transkripční faktory se při buněčné signalizaci vyskytují ve 2 formách, a to jako aktivátory  $GLI^A$ , na kterých se podílí zejména GLI2, a jsou vytvářeny ve chvíli, kdy není SMO inhibován. V případě inhibice SMO jsou GLI proteiny proteolyticky štěpeny na represory  $GLI^R$ , které jsou povětšinou odvozeny od GLI3. Tento třetí člen rodiny GLI faktorů působí v buňce jako represor transkripce (Litington et al., 2002) a jeho ztráta či mutace způsobuje malformaci končetin (Schimmang et al., 1992).

Potřebným proteinem k vytvoření represorové formy  $GLI^R$  je Supresor of fused homolog (SUFU). Jeho funkcí je vázat, stabilizovat a uchovávat GLI3 v cytoplazmě buňky (Monnier et al., 1998; Rubin a de Sauvage, 2006). SUFU je velmi důležitý při vývoji embrya, jeho absence či nefunkčnost v buňce vede k úmrtí plodů (Svård et al., 2006).

Na tvorbě  $GLI^R$  má také velký podíl glycogen synthase kinase 3- $\alpha$  (GSK3A) (Hui a Angers, 2011), který je označován za molekulu umožňující proliferaci a diferenciaci kmenových buněk při vývoji mozku (Kim, 2009), zároveň je pro správnou funkci mozku potřebný i v dospělosti. Vyšší koncentrace GSK3A nalezneme v mozečku, mozkové kůře, hipokampu aj. (Kaidanovich-Beilin a Wootgett, 2011). Jeho homolog, glycogen synthase kinase 3- $\beta$  (GSK3B), je důležitý pro energetický metabolismus a vývoj nervových buněk (Plyte et al., 1992) (Obr. 4).



**Obr. 4** Tvorba aktivní a represorové formy GLI ve stavu bez HH ligandu a s HH ligandem.

Také cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA) ovlivňují vnik  $GLI^R$  (Obr. 4). HH dráha je ve všech nervových buňkách za nepřítomnosti PKA plně aktivní. Hlavní funkcí PKA jako negativních regulátorů HH dráhy je zabránění přechodu GLI do aktivní formy. Existují tři katalytické podjednotky PKA a čtyři regulační podjednotky. Katalytickými podjednotkami jsou protein kinase cAMP-dependent catalytic  $\alpha$  (PRKACA),  $\beta$  (PRKACB) a  $\gamma$  (PRKACG) (Wu et al., 2013). Regulačními podjednotkami jsou Protein kinase cAMP-dependent regulatory, type I  $\alpha$  (PRKAR1A), I  $\beta$  (PRKAR1B), II  $\alpha$  (PRKAR2A) a II  $\beta$  (PRKAR2B). PKA holoenzymový tetramer se tedy za přítomnosti cAMP rozkládá na dvě katalytické podjednotky (C) a dvě regulační podjednotky (R) (McKnight et al., 1988).

Na převodu GLI do aktivní formy se podílí protein serine/threonine kinase 36 (STK36), který inhibuje protein SUFU. Nedávné studie navíc ukázaly, že STK36 není důležitý při embryonálním vývoji, jelikož se začíná v buňkách vytvářet až po porodu (Chen et al., 2005). Naopak Potassium channel tetramerization domain-containing protein 11 (KCTD11) negativně reguluje HH dráhu tak, že působí jako antagonist GLI1 a ovlivňuje jeho přenos do jádra, kde ve své aktivní formě spouští transkripci (Di Marcotullio et al., 2004) (Obr. 4).

Kinesin family member 7 (KIF7) působí jako negativní i pozitivní regulátor HH dráhy (He et al., 2014). Negativně reguluje HH signalizaci tím, že zabraňuje přechodu GLI2 do aktivní formy za nepřítomnosti ligandu. Pozitivně pak za přítomnosti ligandu brání zpracování transkripčního faktoru GLI3 do formy represorové. Hlavním aktérem při degradaci proteinu GLI2 v proteazomu je beta-transducin repeat-containing protein (BTRC) (Bhatia et al., 2006). Je členem skupiny F-box proteinů, což jsou tzv. E3 ubiquitin ligázy zodpovědné právě za proteinovou degradaci v buňce.

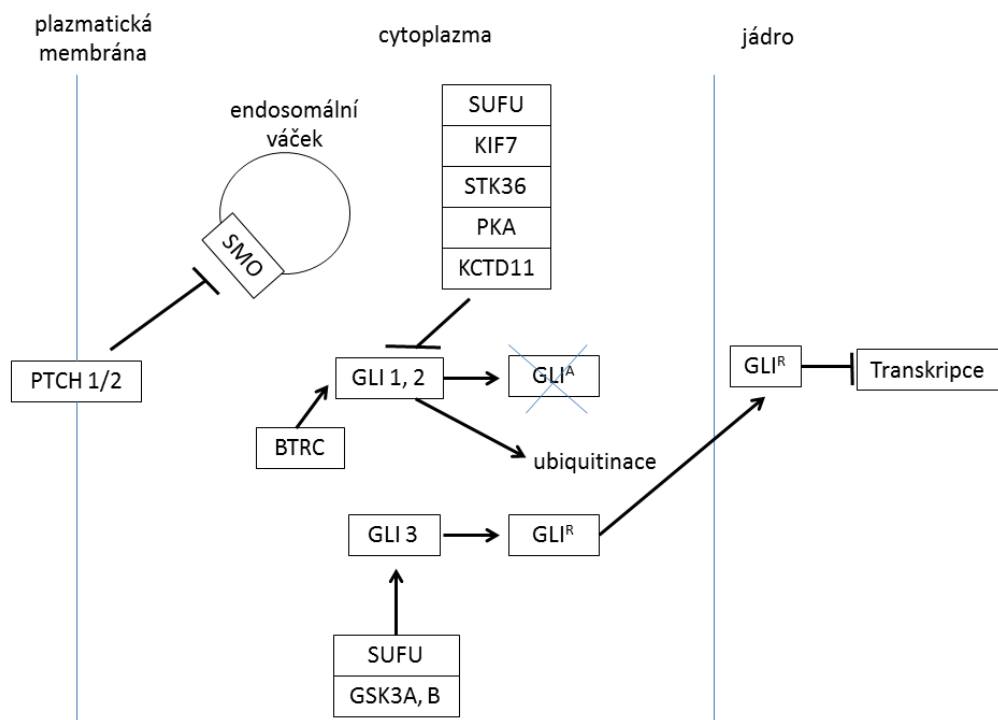
### **3.2 Průběh signální dráhy**

Jak již bylo řečeno, HH signální dráha je u dospělého jedince za normálního stavu neaktivní, což je stav, kdy se nevytváří ani jeden z HH ligandů (IHH, DHH, SHH), které by se navázaly na receptor PTCH1 či PTCH2 a způsobily by tak aktivaci dráhy (kap. 2.2.1).

Pro nádorové buňky je naopak typická dráha aktivní, jsou tedy sekreční buňkou vytvářeny HH ligandy, které svou vazbou s PATCH1/2 spouští kaskádu, na jejímž konci dochází ke spuštění transkripce a expresi cílových genů (kap. 2.2.2).

### 3.2.1 Bez navázaného ligandu

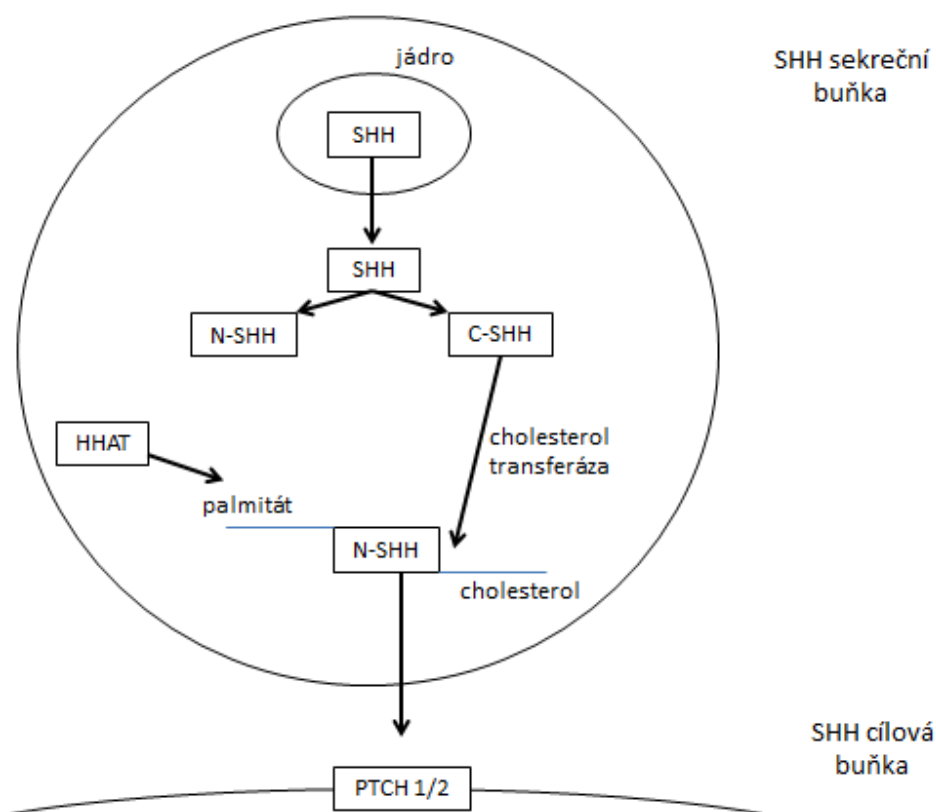
Ve stavu bez HH ligandu se PTCH1 nachází na plazmatické membráně buňky a SMO protein je na membráně intracelulárních endosomálních váčků (Rubin a de Sauvage, 2006; Xie, 2011). Odhaduje se, že se uvnitř buňky vytváří malé endogenní molekuly, které jsou odváděny přes PTCH1 ven z buňky, nemohou se proto navázat na SMO a aktivovat tak jeho funkci. Za těchto okolností dochází také k fosforylaci GLI3 proteinu působením GSK3A, GSK3B a SUFU a vytváří se represorová forma  $GLI^R$ , která migruje do jádra a umlčuje zde expresi cílových genů HH. Zároveň jsou inhibovány proteiny GLI1 a 2 působením KIF7, STK36, PKA, KCTD11 a SUFU, které tak zabraňují přeměně v aktivní formu  $GLI^A$  (Obr. 5).



Obr. 5 Průběh HH signální dráhy bez navázání ligandu.

### 3.2.2 S navázaným ligandem

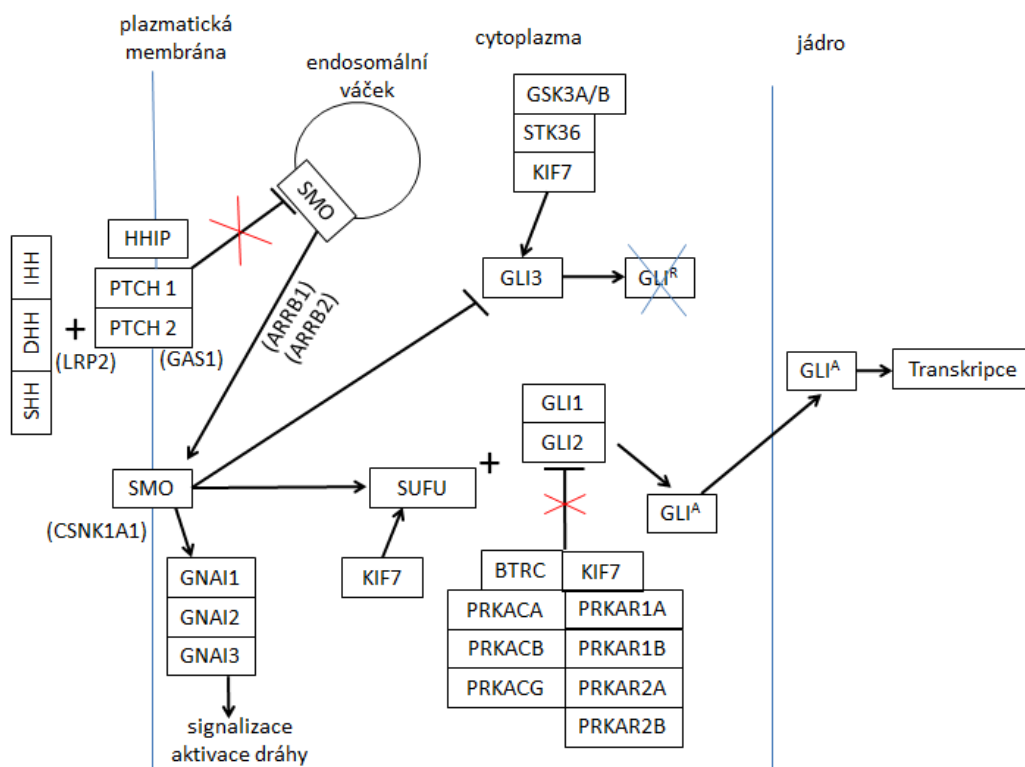
Proteolytickým štěpením vznikají z SHH dva proteiny. N-koncový protein (N-SHH) velký 19 kDa, zprostředkovávající všechny signalizace, a C-koncový protein (C-SHH) o velikosti 25 kDa, který je díky své proteasové aktivitě schopen degradovat HH prekursor (Porter et al., 1995). Díky proteinu HHAT dochází k navázání palmitátu na N-SHH a zároveň C-SHH pracující jako cholesterol transferasa indukuje kovalentní navázání cholesterolu na N-SHH. Navázáním cholesterolu je N-SHH nasměrován ze sekreční buňky do extracelulárního matrix a získává specifické vlastnosti k vazbě s PTCH1/2 cílové buňky (Litwack et al., 2012; Bumcrot et al., 1995) (Obr. 6).



**Obr. 6** Vznik N-SHH v sekreční buňce (Litwack et al., 2012; převzato a upraveno).

Jestliže nejsou HH ligandy vychytávány proteinem HHIP, který vazbou s ligandy snižuje aktivitu dráhy, dojde k vazbě SHH/IHH/DHH s PTCH1/2 pomocí proteinu LRP2. PTCH1 protein je destabilizován a není schopen dále odvádět ven z buňky přes membránu endogenní molekuly (Rubin a de Sauvage, 2006; Xie, 2011). Ty se v cytoplasmě hromadí, navážou se na SMO a aktivují jej. Aktivace SMO se projevuje jako ztráta inhibice PTCH1,2 proteinů a přemístění SMO do plazmatické membrány, což je umožněno také díky proteinům ARRB1, 2.

Ve stavu s malým množstvím HH ligandů pracuje také GAS1 protein, který signál vazby na PTCH1/2 zvyšuje. Fosforylací SMO proteinu pomocí CSNK1A1 je navýšena hladina SMO. Tento protein poté interaguje s G proteiny GNAI1/2/3 a signalizuje aktivaci HH dráhy. Následně aktivuje spolu s KIF7 protein SUFU který s GLI1 a GLI2 vytvoří komplex SUFU-GLI. Ruší se také inhibice GLI1 a 2 proteinů proteiny BTRC, KIF7 a PKA, což umožňuje vznik  $GLI^A$  a zároveň vzniká inhibiční vazba STK36, KIF7 a GSK3A/B s GLI3, kterou zabraňují přeměnu GLI3 na  $GLI^R$ . Vzniklá aktivní forma GLI se přesouvá do jádra a reguluje expresi HH cílových genů (Obr. 7).



Obr. 7 Průběh HH signální dráhy s navázaným ligandem.

### 3.3 Role SHH u karcinomu pankreatu

Ve zdravé tkáni slinivky břišní není HH signální dráha aktivována, vzhledem k nulové expresi genů *SHH* a *PTCH1*. Aberantní exprese těchto dvou genů na úrovni mRNA i proteinu byla naopak detekována v 70 % PDAC, a to i v případě časných prekancerósních lézí (PANIN), které ještě nejsou považovány za invazivní karcinomy (Thayer et al., 2003). U myších modelů, kterým byla navozena exprese *SHH* pomocí transfekce Pdx-1 promotoru, docházelo ve tkáni slinivky k transformaci epitelu na intestinální fenotyp, který odpovídal svými charakteristikami prekursorům PDAC, a to konkrétně lézím typu PANIN1-2 (Thayer et al., 2003). U těchto lézí byly navíc přítomny mutace genu *KRAS* (V-KI-RAS2 kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) v kodonu 12.

Při testování exprese HH dráhy *in vitro* na 26 buněčných liniích PDAC byla u všech nalezena vyšší exprese minimálně 2 zástupců HH dráhy, včetně *PTCH1*, *SMO*, *HHIP* a *GLII* (Thayer et al., 2003).

Na počátku výzkumu HH dráhy byla zvažována hypotéza, že k její aktivaci dochází prostřednictvím samotných pankreatických nádorových buněk (Thayer et al., 2003). Tato skutečnost byla v následujících letech zpochybněna, jelikož bylo zjištěno, že *SHH* ligand produkovaný nádorovými buňkami neaktivuje dráhu v samotných nádorových buňkách, nýbrž parakrinně v buňkách nádorového stroma (Yauch et al., 2008), což je vazivové okolí nádorových buněk, ve kterém jsou přítomny cévy, fibroblasty a buňky imunitního systému.

Hypotéza této parakrinní signalizace v případě HH signální dráhy byla potvrzena na dalších myších modelech (Tian et al., 2009; Bailey et al., 2009). Pro růst nádorů je tedy velmi důležitá interakce stromatu s maligními epitelovými buňkami, jež je zprostředkována mezibuněčnou signalizací a je velmi komplexní. Nádorové stroma zajišťuje nejen výživu nádorových buněk, ale slouží také jako mechanická ochrana (Rucki et al., 2014). Taky produkuje řadu proteinů, které ovlivňují nádorový růst, invazivitu a v neposlední řadě významně přispívá k rezistenci vůči protinádorové léčbě (Mohelníková-Duchoňová et al., 2013).

Dřívější práce uvádějí, že SHH ligand stimuluje angiogenezi u PDAC. Zvyšuje expresi Hypoxie indukujícího faktoru-1 $\alpha$  (HIF1A) a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) nejen ve fibroblastech (Tian et al., 2009), nýbrž i v progenitorových endoteliálních buňkách (Yamazaki et al., 2008). Nicméně v novější studii autoři prokázali, že naopak v důsledku hypoxie dochází k expresi HIF1A, který aktivuje expresi SHH ligandu nádorovými buňkami (Spivak-Kroizman et al., 2013) a při inhibici HIF1A dochází k zastavení SHH exprese.

Dalším důležitým poznatkem v této tématice je fakt, že epiteliální mesenchymální přechod (Epithelial Mesenchymal Transition - EMT) může být klíčovým mechanismem šíření nádorových buněk PDAC do dalších orgánů pacienta. Během EMT dochází ke ztrátě schopnosti epiteliálních buněk adherovat navzájem a mění se v mesenchymální kmenové buňky, které jsou charakteristické zvýšenou invazivitou a schopností se pohybovat do vzdálených míst neboli metastazovat (Li et al., 2012, Mathew et al., 2014). Přítomnost EMT byla detekována *in vivo* na pacientech s PDAC. V těchto nádorových tkáních byla zvýšená exprese typických mesenchymálních markerů jako je fibronektin, vimentin a N-cadherin. Pacienti s prokázaným EMT vykazovali horší přežití než pacienti, u nichž přeměna na mesenchymální buňky neproběhla (Grippe et al., 2012).

Je také známo, že část nádorových buněk pankreatu vykazuje vlastnosti buněk kmenových a díky nim jsou tyto buňky schopny sebeobnovy tkáně, proliferace a diferenciaci (Li et al., 2007). Co je ovšem hlavní, vykazují rezistenci vůči obvyklým léčbám jako je chemoterapie a radioterapie (Hermann et al., 2007; Ma et al., 2013). Testování přítomnosti kmenových nádorových buněk v nádorech slinivky břišní bylo prováděno *in vivo* na myších xenograftech, kterým byly vpraveny primární lidské pankreatické adenokarcinomy (Li et al., 2007). Bylo zjištěno, že inhibicí HH signální dráhy dochází k omezení sebeobnovy a zrušení chemorezistence (Huang et al., 2012).

## **PRAKTICKÁ ČÁST**



## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Expres genů a proteinů HH signální dráhy byly měřeny ve třech buněčných kulturách adenokarcinomu pankreatu a ve tkáních z nádorových xenograftů (chirurgicky vložený štěp tkáně příjemci odlišného živočišného druhu než je dárce), které byly z těchto parenterálních buněčných linií připraveny.

#### 4.1.1 Použité buněčné kultury

Buněčné kultury se vzájemně lišily genetickými mutacemi klíčových genů kancerogeneze PDAC (Tab. 1) i biologickým chováním. Další faktor, kterým se dané linie odlišovaly, byl stupeň diferenciaci, tzv. grade, který je měřítkem, jak moc se nádorová buňka odlišuje od buněk zdravých. Buňky s gradem 1 (G1) vykazují relativně normální vzhled buněk a normální diferenciaci, G2 značí střední stupeň diferenciaci a G3 jsou špatně diferencované nádory vyznačující se obecně nejhorší prognózou.

**BxPC-3** je buněčná linie kultivovaná z adenokarcinomu G2-3 těla pankreatu 61-leté pacientky. Žena podstoupila radioterapii a chemoterapii, o 6 měsíců později zemřela bez známek generalizace (Tan et al., 1986). Z pozdějšího výzkumu je také známo, že tato buněčná linie se rozšiřuje ve slinivce a zasahuje také do sleziny (Bouvet et al., 2000).

**MIA PaCa-2** je linie kultivovaná z G3 těla a ocasu PDAC 65-letého pacienta s lokálně pokročilým tumorem infiltrujícím okolí aorty v roce 1975 (Yunis et al., 1977). Na rozdíl od linie BxPC-3, roste pomaleji ve slinivce, ale rychle metastazuje do vzdálenějších tkání, jako jsou játra a lymfatické uzliny (Bouvet et al., 2000).

**PaCa-44** je buněčná linie kultivovaná z karcinomu pankreatu s gradem 2 a s vysokým metastatickým potenciálem. Metastáze byly nalezeny v plicích, stěnách jícnu a pleurální dutině (Elsässer, 1993).

**Tab. 1** Charakteristika vyšetřovaných buněčných linií se zaměřením na generační dobu a mutace důležitých genů.

	<b>BxPC-3</b>	<b>MIA PaCa-2</b>	<b>PaCa-44</b>
<b>Generační doba (hod)</b>	24,0	15,6	19,0
<b>KRAS</b>	WT	G12C	G12V
<b>TP53</b>	c.659A>G	c.742C>T	c.526T>A
<b>CDKN2A/p16</b>	Homozygot delece	Homozygot delece	metylace
<b>SMAD4/DPC4</b>	c.1_1659del1659	WT	WT
<b>Ref.</b>	Sipos, 2003	Moore, 2001	Moore, 2001

*Legenda:* WT – standardní typ, KRAS - V-KI-RAS2 kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, TP53 - tumor protein p53, CDKN2A/p16 – cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, SMAD4/DPC4 - SMAD family member 4

#### 4.1.2 Použité xenografty

Xenografty byly připraveny podkožní aplikací suspenze výše popsaných buněčných linií dospělým imunodeficientním nude myším jedincům na spolupracujícím pracovišti (dr. Kočík, Institut klinické a experimentální medicíny). Myši byly léčeny experimentálním SBT (Stony Brook Taxane) taxanem SBT-1214 (MIA PaCa-2 a BxPC-3) a SBT-1216 (PaCa-44) v dávce 10 mg/kg intra peritoneálně jednou za týden po dobu 2 týdnů (2 dávky) viz Tab. 2. Den po druhé dávce byly myši zahubeny. Nádory byly chirurgicky vyjmuty za sterilních podmínek a zmrazeny na -80 °C do doby izolace RNA. RNA byla připravena pracovníky Laboratoří toxikogenomiky Státního zdravotního ústavu v Praze, dle dříve zavedené a popsané metodiky (Mohelníková-Duchoňová et al., 2013).

**Tab. 2** Seznam testovaných xenograftů

Vzorek	Buněčná linie	Terapie	Počet dávek	Den odběru nádoru	Objem nádoru [mm <sup>3</sup> ]
<b>X19</b>	PaCa-44	bez léčby	0	60	2844
<b>X21</b>	PaCa-44	bez léčby	0	60	8377
<b>X23</b>	PaCa-44	bez léčby	0	53	12165
<b>X24</b>	PaCa-44	bez léčby	0	53	4955
<b>X25</b>	PaCa-44	bez léčby	0	53	6944
<b>X43</b>	PaCa-44	bez léčby	0	51	2228
<b>X44</b>	PaCa-44	bez léčby	0	44	784
<b>X36</b>	PaCa-44	SB-T 1216	2	29	148
<b>X37</b>	PaCa-44	SB-T 1216	2	29	171
<b>X38</b>	PaCa-44	SB-T 1216	2	29	385
<b>X41</b>	PaCa-44	SB-T 1216	2	33	706
<b>X42</b>	PaCa-44	SB-T 1216	3	30	1492
<b>X52</b>	MIA PaCa-2	SB-T 1214	2	29	484
<b>X53</b>	MIA PaCa-2	SB-T 1214	2	30	475
<b>X54</b>	MIA PaCa-2	SB-T 1214	2	30	278
<b>X54A</b>	MIA PaCa-2	SB-T 1214	3	36	838
<b>X55</b>	BxPC-3	SB-T 1214	3	66	342
<b>X56</b>	BxPC-3	SB-T 1214	3	66	360
<b>X57</b>	BxPC-3	SB-T 1214	3	66	760
<b>X58</b>	BxPC-3	SB-T 1214	2	66	42

## **4.2 Kontrola integrity a kvantity RNA**

Před stanovením exprese jednotlivých genů byla pracovníky Laboratoří toxikogenomiky Státního zdravotního ústavu v Praze provedena kontrola kvality a integrity RNA. Koncentrace izolované RNA byla stanovena pomocí fluorescenční metody za využití Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kitu (Invitrogen, Carlsbad, CA) a přístroje Infinite M200 (Tecan, Vienna, Austria).

Kontrola integrity RNA byla určena pomocí RIN (RNA integrity number). Stanovení RIN je jedním z hlavních kroků analýzy genové exprese. Princip měření je založen na elektroforéze prováděné na mikro-čipu. RNA vzorky se elektroforeticky oddělí a poté následuje detekce fluorescence pomocí laseru. Bioanalyzátor vygeneruje elektroforeogram, graf závislosti fluorescence vzorku na čase a integrity RNA je vypočítána z poměru 18S a 28S podjednotky RNA a úrovně signálu před markerem 5S oblasti. Číselná hodnota RIN může být vyjádřena jako desetinné či celé číslo od 0 do 10. Standardně se používají vzorky s  $RIN \geq 7$  (Mueller et al., 2004).

### **4.2.1 Přístroje**

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), IKA vortex, Model MS2-S8/MS2-S9 (Agilent Technologies)

### **4.2.2 Kit**

RNA Nano 6000 LabChip kit (Agilent Technologies)

### **4.2.3 Pracovní postup**

Komponenty RNA Nano 6000 LabChip kitu byly ponechány 30 minut při pokojové teplotě. Poté byl připraven gel centrifugací 550  $\mu$ l Agilent RNA 6000 Nano gel Matrixu přes filtr ve speciální zkumavce (součást kitu). Smícháním 1  $\mu$ l RNA 6000 Nano dye koncentrátu s 65  $\mu$ l připraveného gelu vznikl Gel Dye mix, který byl v množství 9  $\mu$ l nanesen do pozice „G“ čipu. Do všech 12 jamek pro stanovování vzorků a do jamky pro ladder bylo nanesen 5  $\mu$ l RNA 6000 Nano markeru. Vzorky RNA byly zdenaturovány 2 minuty za teploty 70 °C a nanесeny na čip po 1  $\mu$ l. Čip byl umístěn v horizontální poloze do vortexu na 60 sekund. Poté byl čip analyzován na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer pomocí výrobcem dodávaného softwaru Agilent 2100 expert software Revision B.02.02.

## **4.3 Syntéza cDNA**

Vzorky mRNA s dostatečnou integritou RNA ( $RIN \geq 7$ ) a kvantitou ( $n > 1 \mu$ g) byly dále použity k syntéze cDNA (complementary DNA) za pomoci enzymu reverzní transkriptasy.

### 4.3.1 Pístroje

Laminární box Biohazard (Clean Air Engineering, Canton, USA), Termoblok Dry Bath Incubator (Major Science, Saratoga, CA), Termoblok DRI-BLOCK DB-2P (Techne, Staffordshire, UK)

### 4.3.2 Kit

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)

### 4.3.3 Pracovní postup

Veškerá práce byla prováděna sterilně v laminárním boxu a vzorky RNA i kity byly uloženy na ledu. V databázi RNA vzorků byla vyhledána koncentrace a z ní byl vypočítán objem v  $\mu\text{l}$  obsahující 1  $\mu\text{g}$  RNA dle vzorce:

$$V = \frac{1 [\mu\text{g}]}{c [\mu\text{g}/\mu\text{l}]}$$

K tomuto objemu náležely 2  $\mu\text{l}$  Random Hexamer Primeru a poté bylo dopočítáno množství nuclease-free vody na celkový objem 28  $\mu\text{l}$ .

Do každé zkumavky byla napipetována nejprve nuclease-free voda, poté Random Hexamer Primer a vzorek RNA. Po smíchání roztoků s RNA byly mikrozkušavky promíchány a centrifugovány v mikrofuze. Poté byly umístěny do termobloku na 70 °C po dobu 5 minut. Během této doby byl připraven mix pro všechny vzorky do jedné zkumavky, který obsahoval 5× Reaction Buffer, 10 mM dNTP mix a RiboLock RNase inhibitor. Potřebné množství mixu na jeden vzorek bylo 14  $\mu\text{l}$  v němž byly roztoky v poměru 4:2:1. Obsah zkumavek byl opět zamíchán a centrifugován. Následovalo odebrání 4  $\mu\text{l}$  z každého vzorku do nových zkumavek. Tyto zkumavky neobsahovaly reverzní transkriptasu, tudíž sloužily jako negativní kontrola, zda jsou všechny roztoky v používaném kitu bez kontaminace. Po odebrání 4  $\mu\text{l}$  byly pouze do těchto zkumavek přidány 2  $\mu\text{l}$  RevertAid reverzní transkriptasy. Všechny zkumavky byly následně umístěny na 10 minut na stojánek do pokojové teploty 25 °C, poté inkubovány v termobloku o teplotě 42 °C na 60 minut. Následně byla reverzní transkriptasa inaktivována inkubací v termobloku nastaveného na teplotu 70 °C po dobu 10 minut. Než byly vzorky cDNA využity pro další analýzy, byly uloženy do -20 °C.

## 4.4 Kontrola produktů cDNA

Celkový objem získané cDNA byl 40  $\mu\text{l}$  o koncentraci 25  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Kvalita cDNA z hlediska kontaminace genomovou DNA byla ověřena pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) amplifikace fragmentu ubiquitinu C (UBC), kdy produkt amplifikace cDNA je velký 190 bp, produkt amplifikace genomové DNA obsahuje introny a je velký 1009 bp (Souček et al., 2005).

### 4.4.1 Chemikálie

Ethidium bromid, TE pufr (1 M Tris, pH 7,5 a 0,5 M EDTA, pH 8,0), Agarosa, MilliQ voda, Ladder  $\Phi\text{X174}$  DNA-Hae III Digest N3026L (New England Biolabs, Ipswich, USA)

### 4.4.2 Přístroje

GeneAmp PCR System 9700 (AB Biosystems, Waltham, USA), Benchtop 2 UV transilluminator (UVP, California, UK)

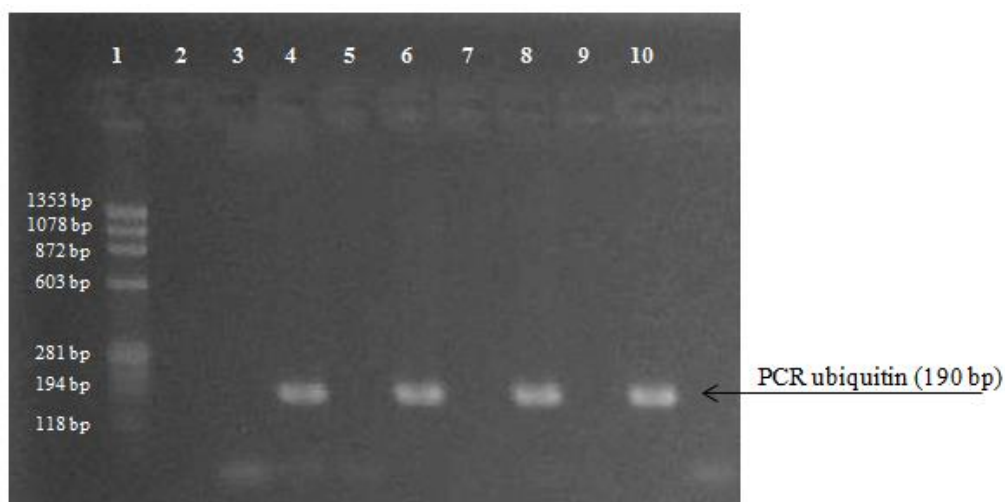
### 4.4.3 Pracovní postup

Pro kontrolu kvality cDNA byl připraven mix pro příslušné množství vzorků (Tab. 3). Tento mix byl poté přidán ke každému vzorku v objemech 9,5  $\mu\text{l}$  mixu a 0,5  $\mu\text{l}$  cDNA.

Tab. 3 Mix na 1 vzorek

Reagencie	Množství pro 1 vzorek [ $\mu\text{l}$ ]
MilliQ voda	6,90
10 $\times$ buffer	1,00
MgCl <sub>2</sub>	0,40
dNTP mix	0,20
Primer 1	0,25
Primer 2	0,25
ReqTaq polymerase TopBio	0,50

Vzorky byly vloženy na PCR s následujícím programem: 5 minut denaturace DNA při 94  $^{\circ}\text{C}$ , 38 cyklů: 30 sekund rozvolnění cDNA při 94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 sekund při 64  $^{\circ}\text{C}$  pro nasednutí primerů, 30 sekund prodlužování řetězců při 72  $^{\circ}\text{C}$  a 5 minut při 72  $^{\circ}\text{C}$ , kdy je dosyntetizován fragment DNA polymerázou. Mezi tím byl připraven 3% agarosový gel (100 ml 0,5 $\times$  TE pufru smícháno se 3 g agarosy) a po skončení PCR byly vzorky napipetovány do jamek připraveného gelu, přičemž do první jamky byl napipetován marker molekulové hmotnosti. Po doběhnutí elektroforézy následovalo vložení gelu do ethidium bromidu a jeho opláchnutí v MilliQ vodě. Poté byl gel vyfocen pomocí UV transluminátoru, který detekuje ethidium bromid mezi vlákny DNA (Obr. 8).



**Obr. 8** Kontrola vzorků cDNA na 3% agarosovém gelu pomocí PCR amplifikace fragmentu ubiquitinu C, obarveno ethidium bromidem. *Legenda:* Jamka 1 – marker molekulové hmotnosti  $\Phi$ X174, Jamka 3 a následující liché jamky - kontroly, Jamka 4 a následující sudé – vzorky cDNA (190 bp)

## 4.5 Relativní kvantifikace míry exprese genů pomocí real-time PCR

Metoda kvantitativní real-time PCR (qPCR) slouží ke zkoumání fyziologických změn na úrovni exprese genů. Dochází zde k monitorování míry amplifikace úseku cDNA během každého cyklu měřením změn fluorescence, kdy úroveň fluorescence odpovídá množství nasyntetizované cDNA. Použitý TaqMan systém je charakteristický tím, že sonda obsahuje fluorofor kovalentně připojen na 5' konci a zhášec na 3' konci. Principem qPCR je metoda FRET (Försterův rezonanční přenos energie) mezi fluorescenčním barvivem a zhášečem. Jestliže jsou fluorofor a zhášec ve vzájemné blízkosti, dochází k inhibici fluorescence. Inhibice je ale přerušena při syntéze nového vlákna Taq polymerázou, která je schopna svou 3'-5' exonukleázovou funkcí odštěpit ze sondy nukleotid obsahující zhášec. Odštěpením tohoto zhášeče poté dochází k uvolnění fluorescence produkované fluoroforem na druhé straně sondy (Drábek et al., 2012).

### 4.5.1 Chemikálie

TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, USA; Tab. 4), 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix, Nuclease-free voda

### 4.5.2 Přístroje

Centrifuga universal 320 (Hettich), ViiA 7 Real-Time PCR Systém (Applied Biosystems)

### 4.5.3 Pracovní postup

Real-time PCR HH signální dráhy bylo prováděno měřením míry exprese 34 vybraných genů pomocí jim příslušných detekujících testů (Tab. 4).

**Tab. 4** Seznam měřených genů a k nim příslušných detekujících testů (Assay ID).

<b>Gen</b>	<b>Název genu (OMIM)</b>	<b>Assay ID</b>
<i>ARRB1</i>	beta arrestin 1 (107940)	Hs00244533_m1
<i>ARRB2</i>	beta arrestin 2 (107941)	Hs01034127_m1
<i>BTRC</i>	beta-transducin repeat-containing protein (603482)	Hs01046329_m1
<i>CSNK1A1</i>	casein kinase I $\alpha$ (600505)	Hs01077962_m1
<i>DHH</i>	desert hedgehog (605423)	Hs00368306_m1
<i>GAS1</i>	growth arrest-specific 1 (139185)	Hs00266715_s1
<i>GLI1</i>	glioma-associated oncogene homolog (165220)	Hs01110766_m1
<i>GLI2</i>	gli-kruppel family member 2 (165230)	Hs01119974_m1
<i>GLI3</i>	gli-kruppel family member 3 (165240)	Hs00609233_m1
<i>GNAI1</i>	guanine nucleotide-binding protein, $\alpha$ -inhibiting activity polypeptide 1 (139210)	Hs01053355_m1
<i>GNAI2</i>	guanine nucleotide-binding protein, $\alpha$ -inhibiting activity polypeptide 2 (139360)	Hs01064686_m1
<i>GNAI3</i>	guanine nucleotide-binding protein, $\alpha$ -inhibiting activity polypeptide 3 (139370)	Hs01020866_m1
<i>GSK3A</i>	glycogen synthase kinase 3- $\alpha$ (606784)	Hs00997942_m1
<i>GSK3B</i>	glycogen synthase kinase 3- $\beta$ (605004)	Hs00275656_m1
<i>HHAT</i>	hedgehog acyltransferasa (605743)	Hs00911326_m1
<i>HHIP</i>	hedgehog-interacting protein (606178)	Hs01011008_m1
<i>IHH</i>	indian hedgehog (600726)	Hs01081801_m1
<i>KCTD11</i>	potassium channel tetramerization domain-containing protein 11 (609848)	Hs00922550_s1
<i>KIF3A</i>	kinesin family member 3A (604683)	Hs00199901_m1
<i>KIF7</i>	kinesin family member 7 (611254)	Hs00419527_m1
<i>LRP2</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 2 (600073)	Hs00189742_m1
<i>PRKACA</i>	protein kinase cAMP-dependent catalytic $\alpha$ (601639)	Hs00427274_m1*
<i>PRKACB</i>	protein kinase cAMP-dependent catalytic $\beta$ (176892)	Hs01086757_m1
<i>PRKACG</i>	protein kinase cAMP-dependent catalytic $\gamma$ (176893)	Hs01033925_s1
<i>PRKARIA</i>	protein kinase cAMP-dependent regulatory, type I $\alpha$ (188830)	Hs00267597_m1
<i>PRKAR1B</i>	protein kinase cAMP-dependent regulatory, type I $\beta$ (176911)	Hs00406762_m1
<i>PRKAR2A</i>	protein kinase cAMP-dependent regulatory, type II $\alpha$ (176910)	Hs00177760_m1
<i>PRKAR2B</i>	protein kinase cAMP-dependent regulatory, type II $\beta$ (176912)	Hs00176966_m1
<i>PTCH1</i>	patched homolog 1 (601309)	Hs00181117_m1
<i>PTCH2</i>	patched homolog 2 (603673)	Hs01085642_m1
<i>SHH</i>	sonic hedgehog (600725)	Hs03454385_m1
<i>SMO</i>	smoothened homolog (601500)	Hs01090242_m1
<i>STK36</i>	serine/threonine protein kinase 36 (607652)	Hs01036839_m1
<i>SUFU</i>	suppressor of fused homolog (607035)	Hs00960524_m1

Pro qPCR je velmi důležitá volba vhodných vnitřních standardů, tzv. referenčních genů. V ideálním případě jsou tyto referenční geny konstitutivně exprimovány ve všech buněčných typech dané studie, měly by být zcela nezávislé na podmínkách probíhajících experimentů a neovlivnitelné zdravotním stavem jedinců ve studii. Ve studii byly použity

čtyři referenční geny (Tab. 5), které byly dříve popsány jako vhodné referenční geny pro expresní studie na vzorcích PDAC (Mohelníková-Duchoňová et al., 2011).

**Tab. 5** Seznam použitých referenčních genů a k nim příslušných detekujících testů (Assay ID).

Gen	Název genu (OMIM)	Assay ID
<i>ELF1</i>	E74-like factor 1 (189973)	Hs00152844_m1
<i>EIF2B1</i>	eucaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 (606686)	Hs00426752_m1
<i>MRPL19</i>	mitochondrial ribosomal protein L19 (611832)	Hs00608519_m1
<i>POP4</i>	processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP subunit (606114)	Hs00198357_m1

K měření qPCR byly všechny vzorky cDNA o koncentraci 25 ng/μl naředěny 8× nuclease-free vodou. Následně byla připravena reakční směs dle doporučení výrobce (Tab. 6). Pro analýzu byly použity 384 jamkové PCR destičky (Obr. 9) a do každé jamky byly nanесeny 3 μl reakční směsi a 2 μl vzorku cDNA (~6 ng cDNA). Vzorky byly nanášeny vždy v duplikátech a v každé reakci byla přítomna negativní kontrola, v níž byl cDNA templát nahrazen sterilní vodou k vyloučení možnosti kontaminace reakční směsi. Po napipetování reakční směsi a vzorků cDNA byla destička vložena do centrifugy na 1 minutu při 1200 g a 25 °C. PCR reakce probíhaly za následujících podmínek: 2 min. při 50 °C, následovala iniciální denaturace 10 minut při 95 °C, a 40 cyklů střídavé denaturace 15 sec při 95 °C a prodlužování řetězce 60 sec při teplotě 60 °C.

**Tab. 6** Příprava reakční směsi.

Reagencie	Množství pro 1 vzorek [μl]
RNase free voda	1,75
5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix	0,25
TaqMan® Gene Expression Assay	1,00

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<b>A</b>	X19	X35	X52	X59																				
<b>B</b>	X19	X35	X52	X59																				
<b>C</b>	X21	X36	X53	X60																				
<b>D</b>	X21	X36	X53	X60																				
<b>E</b>	X23	X37	X54	BxPC-3																				
<b>F</b>	X23	X37	X54	BxPC-3																				
<b>G</b>	X24	X38	X54A	MIA PaCa-2																				
<b>H</b>	X24	X38	X54A	MIA PaCa-2																				
<b>I</b>	X25	X41	X55	PaCa-44																				
<b>J</b>	X25	X41	X55	PaCa-44																				
<b>K</b>	X43	X42	X56	NCT																				
<b>L</b>	X43	X42	X56	NCT																				
<b>M</b>	X44	X50	X57																					
<b>N</b>	X44	X50	X57																					
<b>O</b>	X34	X51	X58																					
<b>P</b>	X34	X51	X58																					

**Obr. 9** Rozložení vzorků na destičce, kde každá barva odpovídá jinému měřenému genu

*Legenda:* X19-X59 – vzorky xenograftů; BxPC-3, MIA PaCa-2, PaCa-44 – parentální buněčné linie, NCT – negativní kontrola



#### 4.5.4 Analýza míry exprese referenčních genů

Výsledky byly statisticky hodnoceny komparativní  $\Delta\Delta\text{Ct}$  metodou (Livak a Schmittgen, 2001) pomocí softwaru RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis v3.5. (Qiagen, 2014).  $\Delta\Delta\text{Ct}$  metoda umožňuje srovnání míry exprese sledovaných genů vzhledem k většímu počtu genů referenčních a kalkuluje i s procentuální úspěšností PCR reakce při hodnocení rozdílu mezi tkání nádoru a kontrolní nenádorovou tkání. Jedná se o poměr relativní genové exprese mezi kontrolní a testovanou skupinou, kdy poměr větší než 1 značí zvýšenou genovou expresi, naopak poměr 0-1 značí expresi sniženou. Do programu byly vneseny hodnoty Ct (počet cyklů) každého genu. Jako referenční geny pro karcinom pankreatu byly zvoleny geny *MRPL19*, *EIF1*, *POP4*, *EIF2B1* (viz. kap. 3.5.3, Tab. 5). Po zadání dat byly softwarem vypočítány relativní exprese pomocí následujícího postupu:

1. Určení normalizovaných hrubých dat ( $\Delta\text{Ct}$ ) pro daný gen z počtu cyklů (Ct) dle vzorce:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (cílového genu)} - \text{Průměr (Ct (referenčních genů))}$$

2. Výpočet průměrné  $\Delta\text{Ct}$  specifické pro daný gen pomocí vzorce:

$$\text{Průměrné } \Delta\text{Ct} = \frac{(\Delta\text{Ct (vzorek1)} + \Delta\text{Ct (vzorek2)} + \Delta\text{Ct (vzorek3)} + \dots + \Delta\text{Ct (n počet vzorků))}{n \text{ počet vzorků}}$$

3. Stanovení  $\Delta\Delta\text{Ct}$  odečtením  $\Delta\text{Ct}$  kontrolní skupiny od  $\Delta\text{Ct}$  testované skupiny.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (testovaná skupina n)} - \Delta\text{Ct (kontrolní skupina)}$$

4. Převod změny exprese z logaritmické na lineární stupnici podle rovnice:

$$\text{Změna exprese} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$$

Software zároveň posuzuje statistickou významnost rozdílu exprese, kterou vyjadřuje 95% intervalem spolehlivosti (CI) a hodnotou významnosti p, kdy  $p \leq 0,05$  bylo použito jako hranice statistické významnosti.

## 5 VÝSLEDKY

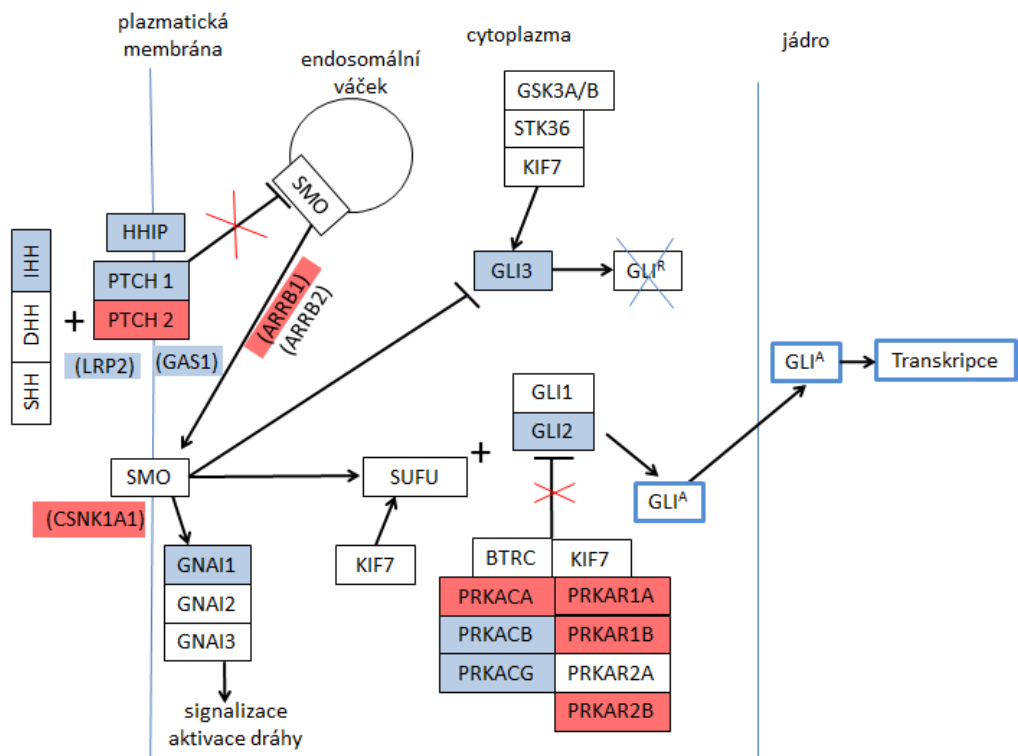
### 5.1 Buněčné linie a xenografty

V této studii byly hodnoceny exprese HH dráhy v xenograftech připravených ze tří parentálních buněčných linií, jmenovitě BxPC-3, PaCa-44 a MIA PaCa-2. BxPC-3 buněčná linie, má nejdelší generační dobu (24 hodin) a nemá přítomnou mutaci v *KRAS* onkogenu, zatímco PaCa-44 a MIA PaCa-2 mutace v genech *KRAS* mají, stejně jako v genech *TP53*, *CDKN2A* a *SMAD4*. MIA PaCa-2 má generační dobu nejkratší (15,6 hodin) a vykazuje nejagresivnější chování, což bylo viditelné již na velikosti nádorů u xenograftů bez léčby taxany v 8. týdnu od implantace, v průměru  $7,1 \text{ cm}^3 \pm 3,5 \text{ cm}^3$ , zatímco u těch taxany léčených pouze  $0,5 \text{ cm}^3 \pm 0,2 \text{ cm}^3$ . BxPC-3 xenografty podstoupily tři cykly chemoterapie a byly usmrceny až po osmi týdnech a xenografty odvozeny od agresivnějších parentálních linií (PaCa-44 a MIA PaCa-2) byly usmrceny již po dvou cyklech chemoterapie (čtyřech týdnech), neboť se třetího cyklu nedoživaly. Velikost nádoru PaCa-44 xenograftů byla v průměru  $0,3 \text{ cm}^3 \pm 0,1 \text{ cm}^3$  a velikost MIA PaCa-2 xenograftů ve stejné době po dvou cyklech chemoterapie byla  $0,5 \text{ cm}^3 \pm 0,2 \text{ cm}^3$ .

### 5.2 Srovnání exprese HH signální dráhy parentálních buněčných linií

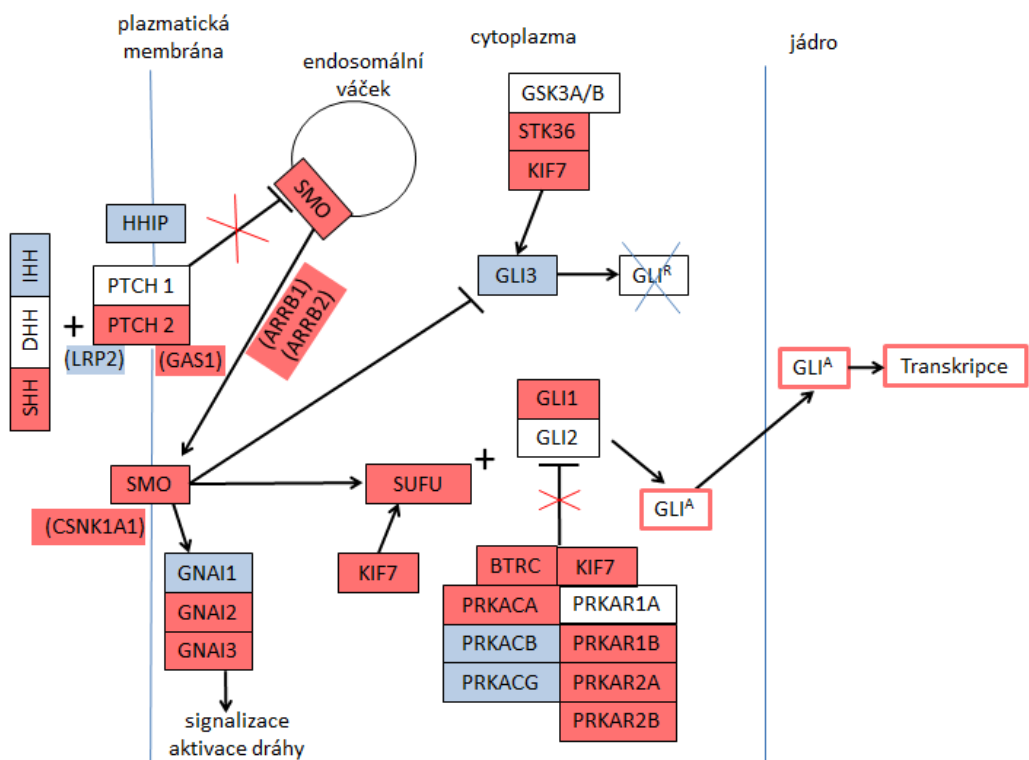
Při srovnání exprese HH signální dráhy tří buněčných linií, které jsou charakteristické odlišností v mutacích genů a jejich biologickým chováním, je u buněčné linie PaCa-44 vzhledem ke kontrolní skupině BxPC-3 viditelná up-regulace u genů *PTCH2*, *PRKAR1B/A*, *PRKAR2B*, *CSNK1A1*, *KIF3A*, *ARBB1* a *PRKACA* (Tab. 7, červeně). Výrazná down-regulace se projevuje u genů potřebných pro správný chod a funkci dráhy, jmenovitě jsou těmito geny *IHH*, *HHAT*, *PTCH1*, *GNAI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PRKACB*, *PRKAR2B*, *ARRB2*, *GAS1* a *HHIP* a *LRP2* (Tab. 7, modře) (Obr. 10).

Při srovnání buněčné linie MIA PaCa-2 vzhledem ke kontrolní skupině BxPC-3 je z Tabulky 7 viditelná vysoká up-regulace klíčových genů aktivujících signální dráhu, jmenovitě geny *SHH*, *PTCH2*, *SMO*, *GLI1*, *GAS1*, a dalších regulátorů dráhy *HHAT*, *PRKAR1B*, *KIF3A*, a *PRKACA* (Tab. 7, červeně). Down-regulace je z výsledků zřejmá u genů *IHH*, *GNAI1*, *GLI3*, *PRKACB/G* a *LRP2* (Tab. 7, modře) (Obr. 11).



**Obr. 10** Schéma deregulace HH signální dráhy u parentální buněčné linie PaCa-44 vzhledem ke kontrolní linii BxPC-3 vycházející z Tab. 7.

*Legenda:* modře down-regulace, červeně up-regulace, bílé beze změny.



**Obr. 11** Schéma deregulace HH signální dráhy u parentální buněčné linie MIA PaCa-2 vzhledem ke kontrolní linii BxPC-3 vycházející z Tab. 7.

*Legenda:* modře down-regulace, červeně up-regulace, bílé beze změny.

**Tab. 7** Srovnání exprese genů HH signální dráhy parentálních buněčných linií PaCa-44 a MIA PaCa-2 vzhledem ke kontrolní linii BxPC-3

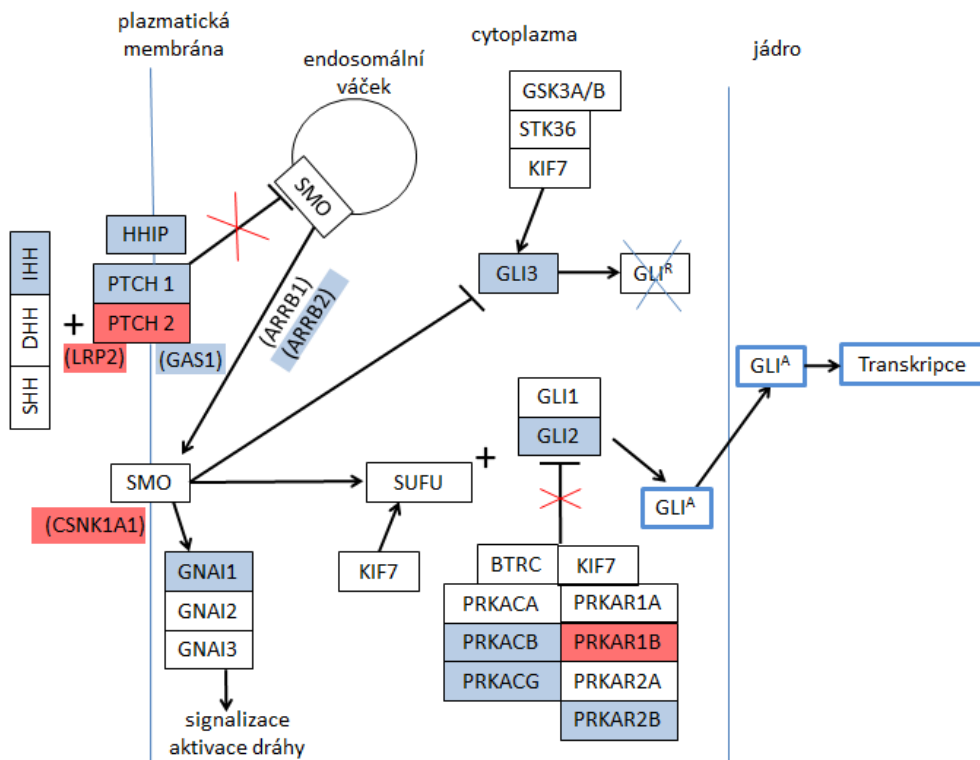
	<b>PaCa-44</b>	<b>MIA PaCa-2</b>
<b>Symbol</b>	<b>Změna exprese</b>	<b>Změna exprese</b>
SHH	0,8	2,2
DHH	1,8	1,4
IHH	0,1	0,3
HHAT	0,5	2,1
PTCH1	0,4	0,6
PTCH2	2,2	56,2
SMO	1,4	10299,8
GNAI1	0,3	<0,1
GNAI2	1,2	2,0
GNAI3	1,8	2,7
KIF7	0,6	2,0
STK36	1,6	3,0
SUFU	1,7	2,2
GLI1	1,4	22,1
GLI2	<0,1	1,5
GLI3	<0,1	<0,1
PRKACB	0,2	0,2
PRKACG	0,2	0,4
PRKAR1A	2,3	1,9
PRKAR1B	3,8	2,4
PRKAR2A	1,4	2,3
PRKAR2B	2,7	154,2
CSNK1A1	3,8	3,6
GSK3A	1,1	1,7
GSK3B	1,6	2,0
KCTD11	0,6	0,2
KIF3A	4,0	7,5
ARRB1	26,5	11,4
ARRB2	1,3	6,1
GAS1	0,1	56,0
HHIP	0,2	0,4
LRP2	0,5	0,2
BTRC	1,2	2,9
PRKACA	4,7	7,5

*Legenda:* Snížená exprese vyznačena modře, zvýšená exprese vyznačena červeně. Statistickou významnost (p-value) nelze hodnotit, jelikož bylo testováno malé množství vzorků.

### 5.3 Rozdíly v expresi xenograftů jednotlivých tří buněčných linií

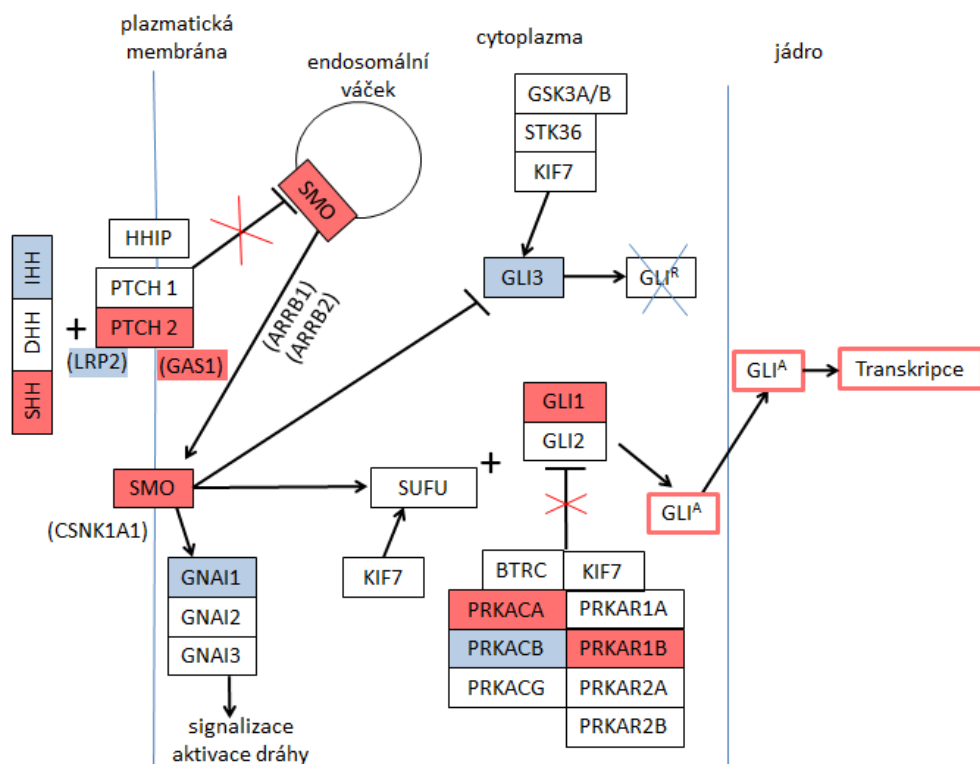
Při srovnání exprese xenograftů tří buněčných linií, které jsou charakteristické odlišností v mutacích genů a jejich biologickým chováním, (Obr. 14) byla u xenograftů buněčné linie PaCa-44 vzhledem ke kontrolní skupině BxPC-3 deregulace shodná s deregulací v samotných parentálních buněčných liniích a to, up-regulace u genů *PTCH2*, *PRKAR1B*, *CSNK1A1*, *KIF3A* (Tab. 8, červeně) a down-regulace u genů *IHH*, *HHAT*, *PTCH1*, *GNAI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PRKACB*, *PRKAR2B*, *ARRB2*, *GAS1* a *HHIP* (Tab. 8, modře) (Obr. 12).

Při srovnání xenograftů buněčné linie MIA PaCa-2 vzhledem ke kontrolní skupině BxPC-3 je v Tabulce 8 viditelná up-regulace klíčových genů aktivujících HH dráhu, jmenovitě *SHH*, *PTCH2*, *SMO*, *GLI1*, *GAS1*, *HHAT*, *PRKAR1B*, *KIF3A*, a *PRKACA* (Tab. 8, červeně). Down-regulace je zřejmá u genů *IHH*, *GNAI1*, *GLI3*, *PRKACB* a *LRP2* (Tab. 8, modře) (Obr. 13).



**Obr. 12** Schéma s vyznačenými up/down-regulovanými geny HH signální dráhy v nádorové tkáni PaCa-44 xenograftů vzhledem ke kontrolní skupině BxPC-3 vycházející z Tab. 8.

*Legenda:* modře vyznačena down-regulace, červeně up-regulace, bílé beze změny.



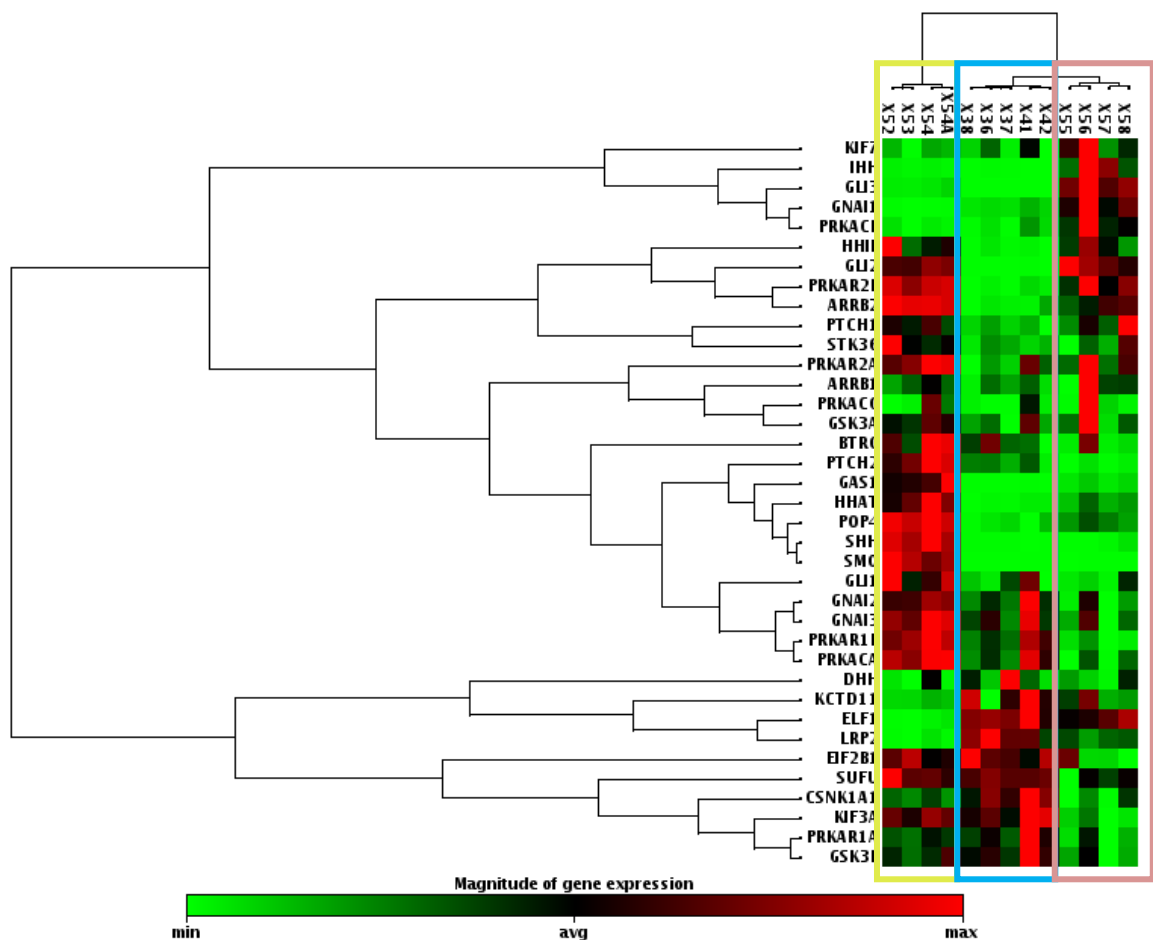
**Obr. 13** Schéma s vyznačenými up/down-regulovanými geny HH signální dráhy v nádorové tkáni MIA PaCa-2 xenograftů vzhledem ke kontrolní skupině BxPC-3 vycházející z Tab. 8.  
*Legenda:* modře vyznačena down-regulace, červeně up-regulace, bílé beze změny.

**Tab. 8** Změny exprese genů buněčné linie PaCa-44 a MIA PaCa-2 vzhledem ke kontrolní skupině BxPC-3

Symbol	PaCa-44			MIA PaCa-2		
	Změna exprese	95% interval spolehlivosti (CI)	p-value	Změna exprese	95% interval spolehlivosti (CI)	p-value
SHH	0,5	(0,00001-1,15)	0,236	<b>69,6</b>	<b>(0,00001-147,93)</b>	<b>&lt;0,001</b>
DHH	1,5	(0,20-2,87)	0,370	0,8	(0,03-1,50)	0,791
IHH	<b>&lt;0,1</b>	<b>(0,00-0,02)</b>	<b>0,006</b>	<b>&lt;0,1</b>	<b>(0,01-0,07)</b>	<b>0,016</b>
HHAT	<b>0,2</b>	<b>(0,14-0,34)</b>	<b>0,002</b>	<b>3,5</b>	<b>(2,05-4,94)</b>	<b>0,002</b>
PTCH1	<b>0,4</b>	<b>(0,16-0,59)</b>	<b>0,031</b>	1,0	(0,49-1,61)	0,905
PTCH2	<b>3,3</b>	<b>(1,14-5,37)</b>	<b>0,019</b>	<b>12,2</b>	<b>(7,21-17,22)</b>	<b>&lt;0,001</b>
SMO	0,7	(0,15-1,30)	0,308	<b>6183,0</b>	<b>(1344,90-11021,03)</b>	<b>&lt;0,001</b>
GNAI1	<b>0,1</b>	<b>(0,06-0,17)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,1</b>	<b>(0,00-0,01)</b>	<b>0,001</b>
GNAI2	1,4	(0,80-2,08)	0,206	<b>1,9</b>	<b>(1,18-2,57)</b>	<b>0,011</b>
GNAI3	1,3	(0,77-1,84)	0,270	<b>1,8</b>	<b>(1,16-2,42)</b>	<b>0,010</b>
KIF7	0,6	(0,30-0,86)	0,075	<b>0,5</b>	<b>(0,32-0,74)</b>	<b>0,040</b>
STK36	0,8	(0,52-1,15)	0,283	1,5	(0,85-2,10)	0,146
SUFU	<b>1,5</b>	<b>(0,93-2,15)</b>	<b>0,017</b>	<b>1,6</b>	<b>(0,92-2,28)</b>	<b>0,043</b>
GLI1	1,3	(0,06-2,46)	0,577	<b>3,8</b>	<b>(1,12-6,38)</b>	<b>0,011</b>
GLI2	<b>&lt;0,1</b>	<b>(0,01-0,02)</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,9	(0,69-1,16)	0,516
GLI3	<b>&lt;0,1</b>	<b>(0,00-0,01)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,1</b>	<b>(0,03-0,09)</b>	<b>&lt;0,001</b>
PRKACB	<b>0,3</b>	<b>(0,15-0,41)</b>	<b>0,006</b>	<b>0,2</b>	<b>(0,15-0,32)</b>	<b>0,008</b>
PRKACG	<b>0,4</b>	(0,00001-1,51)	0,485	1,0	(0,00001-4,08)	0,923
PRKAR1A	<b>1,8</b>	<b>(1,02-2,66)</b>	<b>0,048</b>	1,5	(0,91-2,07)	0,114
PRKAR1B	<b>3,1</b>	<b>(1,37-4,82)</b>	<b>0,019</b>	<b>5,3</b>	<b>(2,98-7,67)</b>	<b>&lt;0,001</b>

PRKAR2A	0,7	(0,43-1,02)	0,195	1,3	(0,89-1,72)	0,168
PRKAR2B	<b>0,1</b>	<b>(0,02-0,10)</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,4	(0,84-1,93)	0,175
CSNK1A1	<b>2,7</b>	<b>(1,22-4,20)</b>	<b>0,004</b>	1,4	(0,67-2,22)	0,294
GSK3A	0,9	(0,48-1,25)	0,507	1,2	(0,72-1,61)	0,622
GSK3B	<b>1,5</b>	<b>(1,07-2,00)</b>	<b>0,032</b>	1,3	(0,94-1,72)	0,118
KCTD11	1,3	(0,04-2,62)	0,317	<b>0,5</b>	(0,23-0,76)	0,096
KIF3A	<b>2,9</b>	<b>(1,79-3,95)</b>	<b>0,002</b>	<b>2,8</b>	<b>(1,87-3,71)</b>	<b>&lt;0,001</b>
ARRB1	0,8	(0,43-1,12)	0,215	0,9	(0,52-1,35)	0,621
ARRB2	<b>0,3</b>	<b>(0,22-0,44)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>1,7</b>	<b>(1,27-2,09)</b>	<b>0,002</b>
GAS1	<b>&lt;0,1</b>	<b>(0,01-0,05)</b>	<b>0,002</b>	<b>10,6</b>	<b>(5,19-15,91)</b>	<b>0,001</b>
HHIP	<b>0,1</b>	<b>(0,04-0,15)</b>	<b>0,005</b>	1,2	(0,35-2,11)	0,608
LRP2	<b>2,0</b>	<b>(1,31-2,72)</b>	<b>0,011</b>	<b>0,3</b>	<b>(0,20-0,36)</b>	<b>&lt;0,001</b>
BTRC	1,1	(0,83-1,34)	0,570	1,3	(1,01-1,67)	0,063
PRKACA	1,7	(0,83-2,54)	0,109	<b>2,7</b>	<b>(1,62-3,83)</b>	<b>&lt;0,001</b>

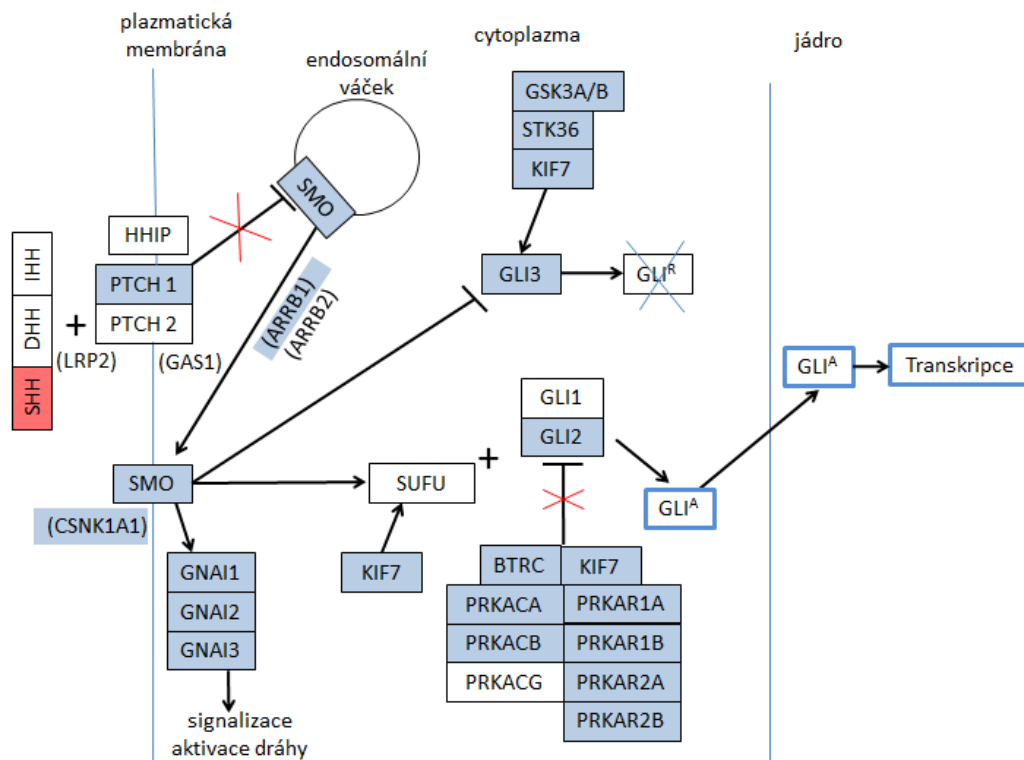
*Legenda:* Snížená exprese vyznačena modře, zvýšená exprese vyznačena červeně, Statistická významnost rozdílu exprese vyjádřena 95% intervalem spolehlivosti. Geny s deregulací významnější než  $p < 0,05$  jsou vyznačeny tučně.



**Obr. 14** Shluková mapa zobrazující expresní profil SBT léčených xenograftů odvozených od tří buněčných linií. *Legenda:* Vzorky vykazují různé úrovně exprese v reakci na léčbu. Červeně - exprese zvýšená, černá - střední, zelená - snížená exprese. Dendrogramy značí korelaci mezi skupinami genů a vzorků. Geny jsou umístěny v řádcích, vzorky ve sloupcích, kdy žlutě je vyznačena skupina xenograftů MIA PaCa-2 (X52-X54A), modře PaCa-44 (X38-X42) a růžově BxPC-3 (X55-58).

## 5.4 Srovnání vzorků linie PaCa-44 léčených SBT a neléčených

Při srovnání exprese HH signální dráhy v nádorové tkáni xenograftů léčených taxany s neléčenými, byl hlavní ligand dráhy, *SHH*, zvýšeně exprimován, přestože ostatní geny na nižších úrovních (downstream) zvýšeně exprimovány nebyly (Obr. 16). Z tabulky 9 (modře) je patrné, že působení HH signální dráhy bylo sníženo, jelikož došlo k down-regulaci většiny významných genů signalizace, jmenovitě *HHAT*, *PTCH1*, *SMO*, *GNAI1*, *GNAI2*, *GNAI3*, *KIF7*, *STK36*, *GLI2*, *GLI3*, *PAK* (katalytické i regulační podjednotky), *CSNK1A1*, *GSK3A*, *GSK3B*, *KIF3A*, *ARRB1* a *BTRC* (Tab. 9, modře) (Obr. 15).



**Obr. 15** Schéma s vyznačenými up/down-regulovanými geny HH signální dráhy v nádorové tkáni PaCa-44 xenograftů léčených taxany vzhledem k neléčeným vycházející z Tab. 9

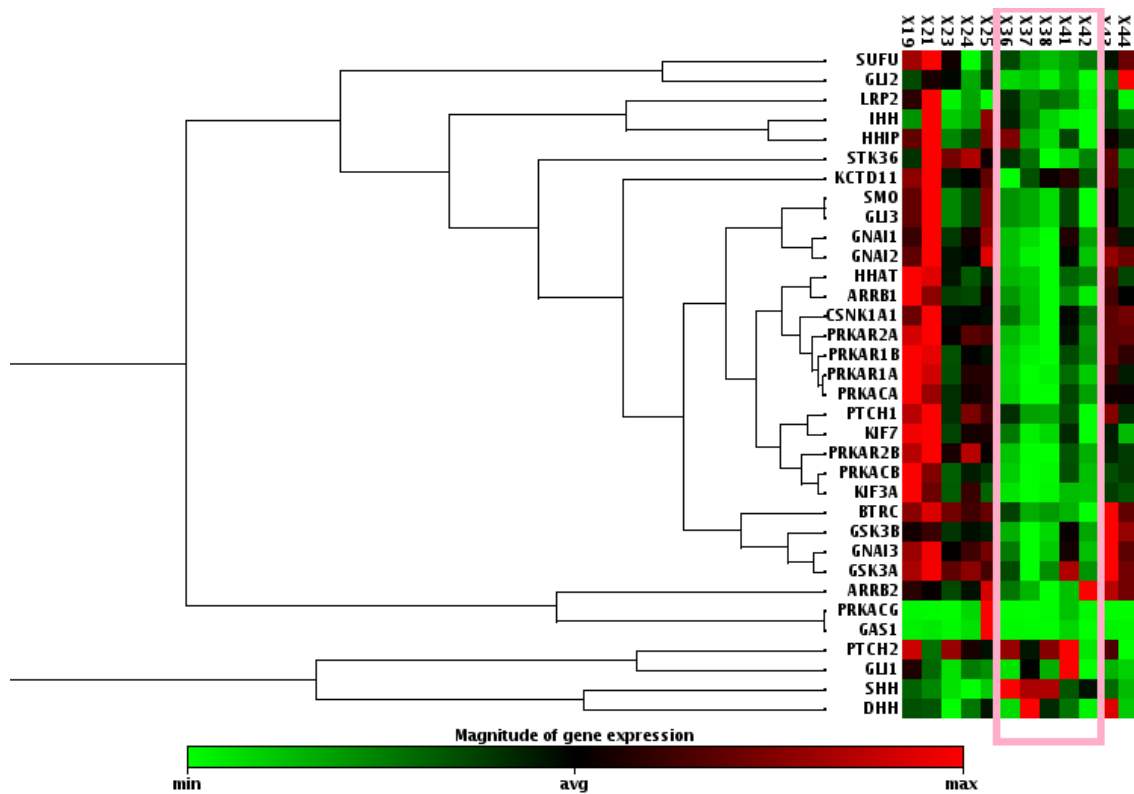
*Legenda:* modře vyznačena down-regulace, červeně up-regulace, bílé beze změny.



**Tab. 9** Srovnání exprese genů HH signální dráhy v nádorové tkáni PaCa-44 xenograftů léčených taxany vzhledem k neléčeným

Symbol	Změna exprese	95% interval spolehlivosti (CI)	p-hodnota
<b>SHH</b>	<b>2,7</b>	<b>(1,53-3,88)</b>	<b>0,001</b>
DHH	1,0	(0,21-1,69)	0,969
IHH	0,5	(0,14-0,87)	0,156
<b>HHAT</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,36-0,69)</b>	<b>0,008</b>
<b>PTCH1</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,33-0,69)</b>	<b>0,003</b>
PTCH2	1,1	(0,34-1,88)	0,656
<b>SMO</b>	<b>0,6</b>	<b>(0,45-0,79)</b>	<b>0,014</b>
<b>GNAI1</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,28-0,68)</b>	<b>0,005</b>
<b>GNAI2</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,34-0,63)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>GNAI3</b>	<b>0,6</b>	<b>(0,43-0,71)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>KIF7</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,30-0,75)</b>	<b>0,025</b>
<b>STK36</b>	<b>0,8</b>	<b>(0,65-0,89)</b>	<b>0,011</b>
SUFU	0,9	(0,78-0,97)	0,062
GLI1	1,0	(0,23-1,86)	0,544
<b>GLI2</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,39-0,68)</b>	<b>0,012</b>
<b>GLI3</b>	<b>0,6</b>	<b>(0,45-0,79)</b>	<b>0,014</b>
<b>PRKACB</b>	<b>0,4</b>	<b>(0,27-0,63)</b>	<b>0,010</b>
PRKACG	0,6	(0,00001-1,99)	0,466
<b>PRKAR1A</b>	<b>0,4</b>	<b>(0,28-0,54)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>PRKAR1B</b>	<b>0,4</b>	<b>(0,23-0,57)</b>	<b>0,002</b>
<b>PRKAR2A</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,33-0,61)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>PRKAR2B</b>	<b>0,2</b>	<b>(0,09-0,40)</b>	<b>0,001</b>
<b>CSNK1A1</b>	<b>0,7</b>	<b>(0,51-0,81)</b>	<b>0,003</b>
<b>GSK3A</b>	<b>0,7</b>	<b>(0,50-0,84)</b>	<b>0,005</b>
<b>GSK3B</b>	<b>0,7</b>	<b>(0,56-0,83)</b>	<b>0,006</b>
KCTD11	0,5	(0,07-0,91)	0,057
<b>KIF3A</b>	<b>0,4</b>	<b>(0,23-0,47)</b>	<b>0,003</b>
<b>ARRB1</b>	<b>0,5</b>	<b>(0,42-0,66)</b>	<b>0,001</b>
ARRB2	0,8	(0,59-0,98)	0,093
GAS1	0,4	(0,00001-0,92)	0,399
HHIP	0,7	(0,42-0,95)	0,095
LRP2	1,0	(0,45-1,56)	0,701
<b>BTRC</b>	<b>0,6</b>	<b>(0,50-0,68)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>PRKACA</b>	<b>0,4</b>	<b>(0,28-0,58)</b>	<b>&lt;0,001</b>

*Legenda:* Snížená exprese vyznačena modře, zvýšená exprese vyznačena červeně. Statistická významnost rozdílu exprese vyjádřena 95% intervalem spolehlivosti. Geny s deregulací významnější než  $p < 0,05$  jsou vyznačeny tučně.



**Obr. 16** Shluková mapa zobrazující expresní profil PaCa-44 xenograftů neléčených a léčených taxany. *Legenda:* Vzorke vykazují různé úrovně exprese v reakci na léčbu. Červená barva vyznačuje expresi zvýšenou, černá střední a zelená sniženou. Dendrogramy ukazují korelaci mezi skupinami genů. Vzorke jsou ve sloupcích, geny v řádcích. Růžově je vyznačena skupina taxany léčených xenograftů.

## 6 DISKUZE

HH signální dráha hraje v dospělosti klíčovou roli v proliferaci a diferenciaci buněk vedoucí ke kancerogenezi i akceleraci růstu nádorů. Ve zdravé tkáni slinivky břišní není HH signální dráha aktivována. Aberantní exprese HH signální dráhy na úrovni mRNA i proteinů byla naopak detekována u PDAC. Při testování exprese HH dráhy *in vitro* na 26 buněčných liniích PDAC byla u všech nalezena vyšší exprese minimálně 2 zástupců HH dráhy, včetně *PTCH1*, *SMO*, *HHIP* a *GLI1* (Thayer et al., 2003). V této práci byla prokázána vyšší exprese klíčových genů aktivujících signální dráhu, a to jmenovitě *SHH*, *PTCH2*, *SMO*, *GLI1*, *GAS1*, *HHAT*, *PRKAR1B*, *KIF3A*, a *PRKACA* u agresivní buněčné linie MIA PaCa-2 s vysokou proliferační aktivitou vzhledem ke kontrolní linii BxPC-3, a to jak v samotných parentálních liniích, tak i u nádorů xenograftů od nich odvozených. Toto zjištění tedy potvrzuje roli HH signální dráhy nejen v samotné kancerogenezi PDAC, ale i v dalších fázích nemoci, rychlosti růstu nádoru a jeho agresivitě.

Duktální adenokarcinom pankreatu je nádorové onemocnění s velmi špatnou prognózou a obtížnou léčbou. Mezi klíčovými faktory špatné prognózy patří i obtížná chirurgická léčba, vysoké procento recidiv po chirurgické léčbě a výrazná chemorezistence těchto nádorů (Mohelníková-Duchoňová et al., 2013). Systémová chemoterapie zůstává jedinou léčebnou možností pro pacienty s lokálně pokročilým či metastatickým onemocněním. Přestože chemoterapie statisticky zlepšuje celkové přežívání PDAC pacientů, celkový přínos této léčby je v současnosti nepříliš významný, a většina pacientů s pokročilým PDAC umírá do jednoho roku od stanovené diagnózy. V praxi se při léčbě PDAC uplatňují zejména chemoterapeutické režimy na bázi nukleosidových analog, jmenovitě 5-fluorouracilu a gemcitabinu, a to buď v monoterapii, nebo v kombinaci s oxaliplatinou a irinotekanem (FOLFIRINOX), nebo nab-paklitaxelem. Přínos inhibitorů HH signální dráhy v terapii PDAC je v současnosti kontroverzní téma. Inhibice HH signální dráhy u xenograftů vede k dávkově závislé redukci růstu objemu nádorů (Bahra et al., 2012). Kombinace těchto inhibitorů se standardní chemoterapií však nepřinesla jednoznačné výsledky. V případě kombinace s cisplatinou vede inhibice HH signální dráhy k synergickému efektu na nádorové buňky, naopak u gemcitabinu a 5-fluorouracilu může přidání HH inhibitorů navodit chemorezistenci (Onishi et al., 2012). Vysvětlením může být, že HH inhibitory navozují G1 blok buněčného cyklu a tím snižují účinnost cytostatik závislých na buněčném cyklu.

Cytostatika ze skupiny taxanů jsou v případě PDAC poměrně málo prozkoumanou oblastí. Kombinace nab-paklitaxelu s gemcitabinem zlepšuje celkové přežívání pacientů. V naší studii jsme použily k léčbě xenograftů experimentální SBT taxany. Velikost nádorů

u xenograftů bez léčby taxany v 8. týdnu od implantace byla v průměru  $7,1 \text{ cm}^3 \pm 3,5 \text{ cm}^3$ , zatímco u těch taxany léčených pouze  $0,5 \text{ cm}^3 \pm 0,2 \text{ cm}^3$ . Přestože hlavní ligand dráhy *SHH*, byl po léčbě zvýšeně exprimován, exprese všech ostatních komponent HH dráhy byla v nádorových buňkách xenograftů po terapii významně snížena. Během terapie taxany tedy dochází k inhibici růstu nádoru a inhibici HH dráhy. Přesný mechanismus není znám. Nicméně taxany stabilizují mikrotubuly a dělicí vřeténko buněk, čímž zastavují buněčné dělení blokací buněčného cyklu v G2/M fázi. Lze tedy očekávat podobně synergický efekt kombinované léčby taxany s HH inhibitory. Sníženou expresi HH dráhy po léčbě taxany lze vysvětlit obecně sníženou proliferací v tkáni nádoru, ovšem nelze vyloučit, že na antiproliferačním efektu se podílí snížení exprese HH dráhy působením taxanů. Tato problematika tedy zůstává otevřená pro další výzkum.

## 7 ZÁVĚR

Cílem teoretické části této práce bylo vypracovat literární rešerši shrnující informace o PDAC, HH signální dráze, jednotlivých proteinech účastnících se přenosu signálu se zaměřením na úlohu v karcinogenezi a progresi karcinomu pankreatu.

Alterace exprese genů HH signální dráhy v PDAC má zásadní roli v patogenezi tohoto onemocnění, nicméně přesný mechanismus, kterým se na karcinogenezi a progresi PDAC podílí, není doposud zcela objasněn. V této práci byly porovnávány expresní hladiny mRNA 34 klíčových genů HH signální dráhy mezi jednotlivými buněčnými liniemi a dále sledován vliv léčby xenograftů experimentálními taxany na tyto hladiny.

*In vivo* na myších modelech byla prokázána významná up-regulace exprese hlavního ligandu HH signální dráhy, *SHH*, u xenograftů po léčbě experimentálními taxany SBT, nicméně další geny v dráze pod tímto ligandem (downstream) byly naopak výrazně down-regulovány. Při srovnání exprese po chemoterapii mezi tumory odvozenými od tří rozdílných parenterálních buněčných linií, byla nalezena výrazně vyšší exprese hlavních genů podílejících se na aktivaci HH signální dráhy u MIA PaCa-2 xenograftů. MIA PaCa-2 buňky vykazují agresivní chování, mají nejkratší generační dobu a rovněž růst tumorů xenograftů odvozených od těchto linií byl nejméně inhibován STB taxany. HH signální dráha tedy může být potenciálním faktorem ovlivňující efekt chemoterapie u PDAC. Výsledky této studie však musí být dále ověřeny *in vitro*, a studiem exprese HH dráhy u pacientů s PDAC. Tato práce je tedy pilotním projektem k následné analýze genů HH signální dráhy, jako potenciálních prognostických biomarkerů u pacientů s PDAC, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon.

## POUŽITÁ LITERATURA

**Bahra M., Kamphues C., Boas-Knoop S., Lippert S., Esendik U., Schüller U., Hartmann W., Waha A., Neuhaus P., Heppner F.** (2012) Combination of hedgehog signaling blockage and chemotherapy leads to tumor reduction in pancreatic adenocarcinomas. *Pancreas*. **41**:222-229.

**Bai C.B., Joyner A.L.** (2001) Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development*. **128**: 5161–5172.

**Bailey J.M., Mohr A.M., Hollingsworth M.A.** (2009) Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene*. **28(40)**:3513-25.

**Bhatia N., Thiyagarajan S., Elcheva I., Saleem M., Dlugosz A., Mukhtar H., Spiegelman V.S.** (2006) Gli2 is targeted for ubiquitination and degradation by beta-TrCP ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. **281(28)**:19320-6.

**Bitgood M.J., Shen L., McMahon A.P.** (1996) Sertoli cell signaling by desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*. **6**:298–304

**Bouvet M., Yang M., Nardin S., Wang X., Jiang P., Baranov E., Moossa A.R., Hoffman R.M.** (2000) Chronologically-specific metastatic targeting of human pancreatic tumors in orthotopic models. *Clin Exp Metastasis*. **18(3)**:213-8

**Bracci P.M., Wang F., Hassan M.M., Gupta S., Li D., Holly E.A.** (2009) Pancreatitis and pancreatic cancer in two large pooled case-control studies. *Cancer Causes Control*. **20(9)**:1723-1731.

**Bumcrot D.A., Takada R., McMahon A.P.** (1995) Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol*. **15(4)**:2294-303.

**Conroy T., Desseigne F., Ychou M., Bouché O., Guimbaud R., Bécouarn Y., Adenis A., Raoul J.L.** (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. **364(19)**:1817-25.

**Di Marcotullio L., Ferretti E., De Smaele E., Argenti B., Mincione C., Zazzeroni F., Gallo R., Masuelli L., Napolitano M., Maroder M., Modesti A., Giangaspero F., Screpanti I., Alesse E., Gulino A.** (2004) REN (KCTD11) is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101(29)**:10833-8.

**Drábek J., Berkovcová J., Džubák P., Hajdúch M., Khouylou M., Koudeláková V., Srovnal J., Staňková M., Trojanec R.** (2012) Detekce nádorových biomarkerů v molekulárně biologické

laboratoři. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 144 s. ISBN 978-80-244-3002-7; str. 63-68

**Elsässer H.P., Lehr U., Agricola B., Kern H.F.** (1993) Structural analysis of a new highly metastatic cell line PaTu 8902 from a primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* **64(4)**:201-7.

**Grippo P.J., Munshi H.G.** (2012) Epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer progression. V *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Transworld Research Network. ISBN-13: 978-81-7895-548-3.

**Halámková J., Burkoň P., Tomášek J., Kiss I., Tuček Š., Šlampa P.** (2010) Současné možnosti léčby karcinomu slinivky břišní, *Remedia*, roč.20, č.6, s.368-373, ISSN: 0862-8947

**Hall T.M., Porter J.A., Beachy P.A., Leahy D.J.** (1995) A potential catalytic site revealed by the 1.7-Å crystal structure of the amino-terminal signalling domain of Sonic hedgehog. *Nature.* **378**:212–216.

**He M., Subramanian R., Bangs F., Omelchenko T., Liem K.F. Jr, Kapoor T.M., Anderson K.V.** (2014) The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nat Cell Biol.* **16(7)**:663-72.

**Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J.W., Guba M., Bruns C.J., Heeschen C.** (2007) Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* **1(3)**:313-23.

**Hermouet S., Aznavoorian S., Spiegel A.M.** (1996) In vitro and in vivo growth inhibition of murine melanoma K-1735 cell by a dominant negative mutant alpha subunit of the Gi2 protein. *Cell Signal.* **8(3)**:159-66.

**House M.G., Choti M.A.** (2005) Palliative therapy for pancreatic/biliary cancer. *Surg Clin North Am.* **85(2)**:359-71.

**Huang F.T., Zhuan-Sun Y.X., Zhuang Y.Y., Wei S.L., Tang J., Chen W.B., Zhang S.N.** (2012) Inhibition of hedgehog signaling depresses self-renewal of pancreatic cancer stem cells and reverses chemoresistance. *Int J Oncol.* **41(5)**:1707-14.

**Hucl T.,** (2012) Karcinom pankreatu, *Gastroenterologie a hepatologie 2012*, roč.66, č.5, s.350-356, ISSN: 1804-7874

**Hui C.C., Angers S.** (2011) Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **27**:513-37.

- Chamoun Z., Mann R.K., Nellen D., von Kessler D.P., Bellotto M., Beachy P.A., Basler K.** (2001) Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science*. **293(5537)**:2080-4.
- Chen M.H., Gao N., Kawakami T., Chuang P.T.** (2005) Mice deficient in the fused homolog do not exhibit phenotypes indicative of perturbed hedgehog signaling during embryonic development. *Mol Cell Biol*. **25(16)**:7042-53.
- Chuang P., McMahon A.** (1999) Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*. **397**:617–621
- Christ A., Christa A., Kur E., Lioubinski O., Bachmann S., Willnow T.E., Hammes A.** (2012) LRP2 is an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals. *Dev Cell*. **22(2)**:268-78.
- Ingham P.W.** (2008) Hedgehog signalling. *Curr Biol*. 2008 Mar 25; **18(6)**:R238-41.
- Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E.** (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. **60**:277-300.
- Jia J., Tong C., Wang B., Luo L., Jiang J.** (2004) Hedgehog signalling activity of Smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature*. **432(7020)**:1045-50.
- Johnson R.L., Rothman A.L., Xie J., Goodrich L.V., Bare J.W., Bonifas J.M., Quinn A.G., Myers R.M., Cox D.R., Epstein E.H. Jr, Scott M.P.** (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* **272(5268)**:1668-71.
- Kaidanovich-Beilin O., Woodgett J.R.** (2011) GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Front Mol Neurosci*. **4**:40.
- Kim W.Y., Wang X., Wu Y., Doble B.W., Patel S., Woodgett J.R., Snider W.D.** (2009) GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat Neurosci*. **12(11)**:1390-7.
- Kinzler K.W., Bigner S.H., Bigner D.D., Trent J.M., Law M.L., O'Brien S.J., Wong A.J., Vogelstein B.** (1987) Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*. **236(4797)**:70-73.
- Kovacs, J. J., Whalen, E. J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., Wang, J., Chen, W., Lefkowitz, R. J.** (2008) Beta-arrestin-mediated localization of Smoothened to the primary cilium. *Science*. **320**:1777-1781.
- Li C., Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M.F., Simeone D.M.** (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. **67(3)**:1030-7.



- Li D., Xie K., Wolff R., Abbruzzese J.L.** (2004) Pancreatic cancer. *Lancet*. **363**:1049-1057.
- Li D., Morris J.S., Liu J., Hassan M.M., Day R.S., Bondy M.L., Abbruzzese J.L.** (2009) Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA*. **301**:2553-2562.
- Li X., Wei G., Wang X., Liu D.H., Deng R.D., Li H., Zhou J.H., Li Y.W., Zeng H.P., Chen D.F.** (2012) Targeting of the Sonic Hedgehog pathway by attractylenolides promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biol Pharm Bull*. **35(8)**:1328-35.
- Litingtung Y., Dahn R.D., Li Y., Fallon J.F., Chiang C.** (2002) Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*. **418**: 979–983.
- Litwack G. et al.** (2012) Hedgehog signaling. *Vitamins and hormones*. Vol 88. ISBN 0083-6726
- Livak K.J., Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*. **25(4)**:402-8
- Loveček M., Klos D., Skalický P., Kysučan J., Neoral Č., Melichar B., Havlík R.** (2010) Chirurgie karcinomu hlavy pankreatu, hodnocení přežívání, *Onkologie* 2010, roč.4, č.6, s.338-341, ISSN: 1802-4475
- Lyons J., Landis C.A., Harsh G., Vallar L., Grunewald K., Feichtinger H., Duh Q.Y., Clark O.H., Kawasaki E., Bourne H.R., McCormick F.** (1990) Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*. **249(4969)**:655-9.
- Maeda Y., Nakamura E., Nguyen M.T.** (2007) Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104(15)**:6382-7.
- Ma J., Tian L., Cheng J., Chen Z., Xu B., Wang L., Li C., Huang Q.** (2013) Sonic hedgehog signaling pathway supports cancer cell growth during cancer radiotherapy. *PLoS One*. **8(6)**:e65032
- Mancuso T.F., el-Attar A.A.** (1967) Cohort study of workers exposed to betanaphthylamine and benzidine. *J Occup Med*. **9**:277-285.
- Martinelli D.C., Fan C.M.** (2007) Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev*. **21(10)**:1231-43.
- Mathew E., Zhang Y., Holtz A.M., Kane K.T., Song J.Y., Allen B.L., Pasca di Magliano M.** (2014) Dosage-dependent regulation of pancreatic cancer growth and angiogenesis by hedgehog signaling. *Cell Rep*. **9(2)**:484-94.

- McKnight G.S., Clegg C.H., Uhler M.D., Chrivia J.C., Cadd G.G., Correll L.A., Otten A.D.** (1988) Analysis of the cAMP-dependent protein kinase system using molecular genetic approaches. *Recent Prog Horm Res.* **44**:307-35.
- Mill P., Mo R., Fu H., Grachtchouk M., Kim P.C., Dlugosz A.A., Hui C.C.** (2003) Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. *Genes Dev.* **17**(2):282-94.
- Mohelníková-Duchoňová B., Maršáková L., Vrána D., Holcátová I., Ryska M., Šmerhovský Z., Slámová A., Schejbalová M., Souček P.** (2011) Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas.* **40**(1):72-8.
- Mohelníková-Duchoňová B., Melichar B.** (2013) Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): do we really have a new predictive biomarker of chemotherapy outcome in pancreatic cancer patients? *Pancreatology.* **13**(6):558-63.
- Mohelníková-Duchoňová B., Oliverius M., Honsová E., Souček P.** (2012) Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma. *Dis Markers.* **32**(3):203-10.
- Monnier V., Dussillol F., Alves G., Lamour-Isnard C., Plessis A.** (1998) Suppressor of fused links fused and Cubitus interruptus on the hedgehog signalling pathway. *Curr Biol.* **8**:583–586.
- Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, Gress T, Bassi C, Klöppel G, Kalthoff H, Ungefroren H, Löhner M, Scarpa A.** (2001) Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.* **439**(6):798-802.
- Mo R., Freer A.M., Zinyk D.L., Crackower M.A., Michaud J., Heng H.H., Chik K.W., Shi X.M., Tsui L.C., Cheng S.H., Joyner A.L., Hui C.** (1997) Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development.* **124**(1):113-23.
- Mueller O., Lightfoot S., Schroeder A.** (2004) RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control. Agilent Application Note, Publication 5989-1165EN.
- Novotvary 2007 ČR.** (2010) IHIS ČR, NOR ČR, Česká Republika, pp24-30. ISBN 978-80-7280-849-6.
- Nusslein-Volhard C., Wieschaus E.** (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**:795–801

- Ogden, S. K., Fei, D. L., Schilling, N. S., Ahmed, Y. F., Hwa, J., Robbins, D. J.** (2008) G protein G-alpha-i functions immediately downstream of Smoothed in hedgehog signalling. *Nature*. **456**:967-970.
- Onishi H., Katano M.** (2014) Hedgehog signaling pathway as a new therapeutic target in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. **20(9)**:2335-42.
- Onishi H., Morifuji Y., Kai M., Suyama K., Iwasaki H., Katano M.** (2012) Hedgehog inhibitor decreases chemosensitivity to 5-fluorouracil and gemcitabine under hypoxic conditions in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. **103**:1272-1279.
- Pepinsky R.B., Rayhorn P., Day E.S.** (2000) Mapping sonic hedgehog-receptor interactions by steric interference. *J Biol Chem*. **275(15)**:10995-1001.
- Plyte S.E., Hughes K., Nikolakaki E., Pulverer B.J., Woodgett J.R.** (1992) Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta*. **1114**:147-162.
- Porter J.A., von Kessler D.P., Ekker S.C., Young K.E., Lee J.J., Moses K., Beachy P.A.** (1995) The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature*. **374(6520)**:363-366
- Quiros R.M., Brown K.M., Hoffman J.P.** (2007) Neoadjuvant therapy in pancreatic cancer. *Cancer Invest*. **25(4)**:267-73.
- Rahnama F., Toftgård R., Zaphiropoulos P.G.** (2004) Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem J*. **378(Pt 2)**:325–334.
- Rubin L.L., de Sauvage F.J.** (2006) Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat rev Drug Discov*. **5(12)**:1026–33.
- Rucki A.A., Zheng L.** (2014) Pancreatic cancer stroma: understanding biology leads to new therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*. **20(9)**:2237-46.
- Ruiz i Altaba A.** (1999) Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet*. **15(10)**:418-25
- Schimmang T., Lemaistre M., Vortkamp A., and Ruther U.** (1992) Expression of the zinc finger gene *Gli3* is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (*Xt*). *Development*. **116**:799–804.
- Sipos B, Möser S, Kalthoff H, Török V, Löhr M, Klöppel G.** (2003) A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch*. **442(5)**:444-52.

**Souček P., Anzenbacher P., Skoumalová I., Dvořák M.** (2005) Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*. **23(9)**:1417-22.

**Spivak-Kroizman T.R., Hostetter G., Posner R., Aziz M., Hu C., Demeure M.J., Von Hoff D., Hingorani S.R., Palculict T.B., Izzo J., Kiriakova G.M., Abdelmelek M., Bartholomeusz G., James B.P., Powis G.** (2013) Hypoxia triggers hedgehog-mediated tumor-stromal interactions in pancreatic cancer. *Cancer Res*. **73(11)**:3235-47.

**Svärd J., Heby-Henricson K., Persson-Lek M., Rozell B., Lauth M., Bergström A., Ericson J., Toftgård R., Teglund S.** (2006) Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell*. **10(2)**:187-97.

**Tan M.H., Nowak N.J., Loor R., Ochi H., Sandberg A.A., Lopez C., Pickren J.W., Berjian R., Douglass H.O. Jr, Chu T.M.** (1986) Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest*. **4(1)**:15-23.

**Thayer S.P., di Magliano M.P., Heiser P.W., Nielsen C.M., Roberts D.J., Lauwers G.Y., Qi Y.P., Gysin S., Fernández-del Castillo C., Yajnik V., Antoniu B., McMahon M., Warshaw A.L., Hebrok M.** (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*. **425(6960)**:851-6.

**Theunissen J.W., de Sauvage F.J.** (2009) Paracrine Hedgehog signaling in cancer. *Cancer Res*. **69(15)**:6007–10.

**Tian H., Callahan C.A., DuPree K.J., Darbonne W.C., Ahn C.P., Scales S.J., de Sauvage F.J.** (2009) Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106(11)**:4254-9.

**Wilkinson S.E., Furic L., Buchanan G., Larsson O., Pedersen J., Frydenberg M., Risbridger G.P., Taylor R.A.** (2013) Hedgehog signaling is active in human prostate cancer stroma and regulates proliferation and differentiation of adjacent epithelium. *Prostate*. **73(16)**:1810-23.

**Wu J., Lu X., Wang Z., Shangguan S., Chang S., Li R., Wu L., Bao Y., Niu B., Wang L., Zhang T.** (2013) Association between PKA gene polymorphism and NTDs in high risk Chinese population in Shanxi. *Int J Clin Exp Pathol*. **6(12)**:2968-74.

**Xie J.** (2011) Hedgehog signaling activation in human cancer and its clinical implications. Springer Science & Business Media; ISBN 1441984348, 9781441984340

**Yamazaki M., Nakamura K., Mizukami Y., Ii M., Sasajima J., Sugiyama Y., Nishikawa T., Nakano Y., Yanagawa N., Sato K., Maemoto A., Tanno S., Okumura T., Karasaki H., Kono T., Fujiya M., Ashida T., Chung D.C., Kohgo Y.** (2008) Sonic hedgehog derived from human

pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer Sci.* **99(6)**:1131-8.

**Yauch R.L., Gould S.E., Scales S.J., Tang T., Tian H., Ahn C.P., Marshall D., Fu L., Januario T., Kallop D., Nannini-Pepe M., Kotkow K., Marsters J.C., Rubin L.L., de Sauvage F.J.** (2008) A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature.* **455(7211)**:406-10.

**Yeo C.J., Abrams R.A., Grochow L.B., Sohn T.A., Ord S.E., Hruban R.H., Zahurak M.L., Dooley W.C., Coleman J., Sauter P.K., Pitt H.A., Lillemoe K.D., Cameron J.L.** (1997) Pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: postoperative adjuvant chemoradiation improves survival. A prospective, single-institution experience. *Ann Surg.* **225(5)**:621-33.

**Yue D., Li H., Che J., Zhang Y., Tseng H.H., Jin J.Q., Luh T.M., Giroux-Leprieur E., Mo M., Zheng Q., Shi H., Zhang H., Hao X., Wang C., Jablons D.M., He B.** (2014) Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res.* **33(1)**:34.

**Yunis A.A., Arimura G.K., Russin D.J.** (1977) Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer.* **19(1)**:128-35

**Zhu G.A., Li A.S., Chang A.L.** (2014) Patient With Gorlin Syndrome and Metastatic Basal Cell Carcinoma Refractory to Smoothed Inhibitors. *JAMA Dermatol.* **150(8)**:877-9.

## **INTERNETOVÉ ZDROJE**

Graf zobrazující stav incidence a mortality karcinomu pankreatu v ČR od roku 1977 do roku 2010. <http://www.svod.cz>; Staženo 25. 12. 2013