

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 06: Zdravotnictví

Mechanismy umožňující nádorovým buňkám přežít extrémní metabolický stres

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 06: Zdravotnictví

Mechanismy umožňující nádorovým buňkám přežít extrémní metabolický stres

Mechanisms enabling the survival of cancer cells under
extreme metabolic stress conditions

Autor: Jana Nguyenová
Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55,
příspěvková organizace
Kraj: Jihomoravský
Vedoucí práce: Mgr. Stjepan Uldrijan, CSc.

Brno 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.



V Brně dne 23.2.2020

.....
Jana Nguyenová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit mé velké poděkování Mgr. Stjepanu Uldrijanovi, CSc., svému externímu konzultantovi, za možnost vypracovat svoji Středoškolskou odbornou činnost pod jeho vedením. Oceňuji jeho vynaložené úsilí a čas, obětavou pomoc a především ochotu, kterou mi v průběhu zpracování práce vždy věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Biologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity za poskytnutí zázemí pro uskutečnění mé práce, přátelský přístup a podporu. Můj další dík patří Mgr. Michaele Medkové za poskytnutí buněčné linie a obětavou pomoc s experimentální částí mé práce.

Anotace

Tato práce vznikla jako soutěžní příspěvek do Středoškolské odborné činnosti. Zabývá se mechanismy, které umožňují nádorovým buňkám přežít extrémní metabolický stres. Nádorové buňky jsou často přechodně vystaveny nedostatku živin či kyslíku. Aby přežily tyto podmínky, musí přizpůsobit svůj energetický metabolismus a buněčné signální dráhy regulující buněčný růst a programovanou buněčnou smrt. Právě přeprogramovaný buněčný metabolismus, jakožto jedna z charakteristik maligní transformace buňky, se již uplatňuje při detekci nádorových buněk v těle pacienta pomocí pozitronové emisní tomografie a je atraktivním cílem pro vývoj nových protinádorových terapií.

V předchozích experimentech bylo zjištěno, že některé nádorové buňky se dokáží vyrovnat i se současnou inhibicí glykolýzy a oxidativní fosforylace, umírají však, pokud je současně zablokován také metabolismus glutaminu. Tato práce navazuje na dosavadní poznatky v oblasti energetického metabolismu buňky a ověřuje schopnost buněk přežít za inhibice hlavních drah metabolismu glukózy. Dále hlouběji analyzuje molekulární mechanismy, jež umožňují nádorovým buňkám přežít za současné inhibice mitochondriálního dýchání a kinázy PIKfyve.

Klíčová slova

Metabolický stres, maligní melanom, Warburgův efekt, kináza PIKfyve, reaktivní kyslíkové radikály

Annotation

This work was created as a contribution to the SOČ competition. It focuses on the mechanisms that allow tumor cells to survive under extreme metabolic stress. Tumor cells are often temporarily exposed to a lack of nutrients or oxygen. To survive these conditions, they must adapt their energy metabolism and cellular signaling pathways to regulate cell growth and programmed cell death. The reprogrammed cellular metabolism, as one of the characteristics of malignant cell transformation, has already been used for the detection of tumor cells in the patient's body by positron emission tomography and represents an attractive target for the development of new anti-cancer therapies.

Previous experiments have shown that some tumor cells could cope with simultaneous inhibition of glycolysis and oxidative phosphorylation. However, they die when glutamine metabolism is blocked as well. This thesis builds on current knowledge in the field of cell energy metabolism and verifies their ability to survive inhibition of the major glucose metabolism pathways. It further analyzes the molecular mechanisms that allow tumor cells to survive concomitant inhibition of mitochondrial respiration and PIKfyve kinase.

Keywords

Metabolic stress, malignant melanoma, Warburg effect, PIKfyve kinase, reactive oxygen species

Obsah

1	ÚVOD	11
2	CÍLE PRÁCE	13
3	TEORETICKÁ ČÁST	14
3.1	Maligní melanom	14
3.2	Metabolismus nádorových buněk.....	16
3.2.1	Normální a nádorová proliferace	16
3.2.2	Metabolismus glukózy	17
3.2.3	Glutamin	20
3.2.4	Role onkogenů a nádorových supresorových genů.....	21
3.2.5	Cílení na metabolismus nádorových buněk	22
3.2.5.1	Cílení na signální dráhy regulující metabolismus	23
3.2.5.2	Cílení na metabolické enzymy	24
3.2.6	Mitochondrie.....	25
3.2.6.1	Využití mitochondrií v cílené terapii nádorových onemocnění.....	25
3.3	Metabolický stres a signalizace kyslíkových radikálů	26
4	MATERIÁLY	27
4.1	Buněčné linie.....	28
4.2	Složení roztoků.....	29
4.3	Seznam protilátek.....	30
4.4	Chemikálie	30
5	METODY	32
5.1	Kultivace buněčných linií.....	32
5.2	Průtoková cytometrie	32
5.3	Detekce proteinů pomocí Western blot analýzy.....	33
5.3.1	Příprava lyzátů pro elektroforézu	33
5.3.2	Příprava polyakrylamidových gelů.....	33
5.3.3	SDS-PAGE	33
5.3.4	Elektroforetický transfer proteinu (Western blotting)	34
5.3.5	Vizualizace proteinů fixovaných na membráně.....	34
5.4	Imunofluorescence a konfokální mikroskopie	34

5.5	Zpracování dat.....	35
6	VÝSLEDKY	36
6.1	Buňky linie A375 a MelJuso jsou odolné vůči extrémnímu metabolickému stresu.....	36
6.2	BRAF ^{V600E} i NRAS-mutantní buňky se dokážou vyrovnat s metabolickým stresem vyvolaným současnou inhibicí glykolýzy a oxidativní fosforylace	38
6.3	2DG nemá ochranný účinek na životaschopnost normálních buněk ošetřených inhibitorem mitochondriálního komplexu I	40
6.4	Inhibitory metabolických drah 2DG a rotenon aktivují AMPK	41
6.5	Inhibice AMPK	43
6.6	Inhibice glutaminolýzy	44
6.7	Inhibice PI3K	46
6.8	Inhibice PIKfyve a mitochondriálního komplexu I.....	47
6.8.1	Inhibice PIKfyve chrání buňky A375 ošetřené inhibitorem mitochondriálního komplexu I před smrtí	47
6.8.2	PIKfyve narušuje endocytózu	49
6.8.3	Inhibice PIKfyve vede ke snížení produkce kyslíkových radikálů.....	51
7	DISKUZE	53
8	ZÁVĚR	58
	POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
	SEZNAM TABULEK	67

Seznam použitých zkratek

2DG	2-deoxy-D-glukóza
2DG-6P	2-deoxyglukóza-6-fosfát
AA	akrylamid
AKT	proteinkináza B
AMPK	kináza aktivovaná adenosinmonofosfátem
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BRAF	proteinkináza B-Raf
BSA	hovězí sérový albumin
DMSO	dimethylsulfoxid
ECL	roztok pro posílení chemiluminiscence
EGFR	epidermální růstový faktor
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem
GLUT	glukózový transportér
GPCR	receptor asociovaný s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát
hFF	lidské fibroblasty předkožky
IDH	isocitrátdehydrogenáza
KRAS	Kirstenův krysí sarkom
MAPK	kináza aktivovaná mitogeny
MK	mastné kyseliny
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NRAS	neuroblastomový RAS
PBS	fosfátový pufr
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk
PET	pozitronová emisní tomografie
PI	propidium jodid

PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP ₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PVDF	polyvinyliden fluorid
RAF	rapidně zrychlený fibrosarkom
RAS	kryší sarkom
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	receptorová tyrosinkináza
SDS	dodecylsírán sodný
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
TBS	pufr s obsahem Tris
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin
TEMED	tetramethylethylendiamin
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol

1 Úvod

Rakovina patří bezesporu k nejobávanějším novodobým civilizačním chorobám. Příčinou této nemoci je transformace zdravé buňky, která má pouze omezenou schopnost dělení, v nesmrtelnou rakovinnou buňku, která se dělí rychle a nekontrolovatelně. Aby mohlo dojít k této transformaci, musí buňka projít sérií genetických změn. Ačkoliv mohou být příčiny genetických mutací i typy nádorů různé, existuje několik charakteristických znaků, jimiž se nádorové buňky vyznačují. Jednou z nich je výrazné přeprogramování energetického metabolismu, aby se uspokojily biosyntetické, bioenergetické a redoxní nároky na rychlý buněčný růst.

Již od minulého století je vznik a růst zhoubných nádorů předmětem výzkumu lékařů a vědců z mnoha oborů. Z terapeutického hlediska jde především o identifikaci rysů, které jsou pro rakovinnou buňku unikátní a které lze využít pro její cílené zničení bez poškození buněk zdravých. A právě jedním z charakteristických znaků rakovinných buněk je pozměnění klíčových funkcí metabolismu. Důvodem těchto změn je zrychlená buněčná proliferace vyžadující velké množství živin a energie pro stavbu nových buněk a transformací metabolických drah se rakovinná buňka těmto vysokým nárokům adaptuje. Potřeby nadměrného příjmu živin u rakovinných buněk využívá taktéž metoda pozitronové emisní tomografie (PET), která pomocí radioaktivně značené deoxyglukózy detekuje výskyt nádoru v těle.

Výraznou anomálii energetického metabolismu lze pozorovat ve zpracování glukózy. Rakovinné buňky upřednostňují rychlou glykolýzu před oxidativní fosforylací i za dostatečného přístupu kyslíku, a proto spotřebovávají obrovské množství glukózy. Mimoto se stávají více závislými na glutaminu. Jejich buněčné dýchání, které je pro normální buňky hlavním zdrojem ATP, je v transformovaných buňkách méně využíváno. Takto změněný metabolismus slouží hlavně pro podporu syntézy nukleových kyselin, aminokyselin a lipidů nezbytných pro růst a následné dělení. Tohoto charakteristického znaku nádorových buněk si všiml již v r. 1922 německý lékař Otto Warburg, po němž fenomén později dostal název Warburgův efekt.

Právě tento specifický jev představující cestu k přežití nádorových buněk však může sloužit i jako účinný nástroj k jejich destrukci. V současné době probíhají klinické studie několika chemických látek, které mají za cíl omezit Warburgův efekt nebo regulovat buněčné pH, a tím výrazně zpomalit rakovinný růst, zatímco ostatní buňky v těle jsou ovlivněny jen minimálně (Zhao *et al.*, 2013). Jednou z těchto látek je 2-deoxyglukóza, analog glukózy, která zastavuje pro dělení rakovinné buňky nepostradatelnou glykolýzu. Je však nutno podotknout, že nevyvolává zásadní odezvu nádoru. Je známo, že například u melanomu se po pár měsících od zahájení léčby často projevuje získaná rezistence, což vyžaduje nalezení nových terapeutických strategií.

V předchozích experimentech bylo zjištěno, že některé nádorové buňky se umí vyrovnat se současnou inhibicí oxidativní fosforylace i glykolýzy, umírají však, pokud je současně zablokován také metabolismus glutaminu (Verlande *et al.*, 2017). První kapitola této práce navazuje na dosavadní poznatky o schopnosti buněk maligního melanomu přežít extrémní metabolický stres a zkoumá jejich životaschopnost při těchto podmínkách.

Další část práce je zaměřena na chování nádorových buněk při současné inhibici mitochondriálního komplexu I a lipidové kinázy PIKfyve. Mitochondrie v rakovinných buňkách mohou být z důvodu mitochondriálních mutací dysfunkční. Mitochondrie proto taktéž představují potenciální cíl pro boj

s rakovinou. Ačkoliv není respirace u transformovaných buněk preferována, stále patří mezi procesy nezbytné k dělení a přežití buňky, neboť je vyžadována pro udržení mitochondriálního membránového potenciálu. Inhibicí mitochondriálního komplexu I proto lze dosáhnout usmrcení rakovinné buňky. V pokusech však byla pozorována nečekaná odpověď buněk s mutací *BRAF*^{V600E} přisoučasné inhibici mitochondriálního komplexu I a lipidové kinázy PIKfyve, jejíž fosfotransferázová aktivita zodpovídá za lokalizaci některých buněčných proteinů na cytosolové straně endozomů a je důležitá pro normální průběh endocytózy.

2 Cíle práce

Znalost funkce metabolických drah, které ovlivňují růst nádorových buněk, je klíčová pro pochopení pozmeněných buněčných pochodů v transformovaných buňkách. Pro léčbu maligního melanomu se již v současné době využívají léčiva, která cílí na nejčastější mutaci kinázy BRAF. Během šesti až osmi měsíců od zahájení léčby se však projevuje získaná rezistence. Předchozí experimenty naznačují, že jedním z důvodů extrémní odolnosti buněk melanomu by mohla být schopnost nádorových buněk adaptovat se na stresové podmínky. Objasnění rezistence buněk maligního melanomu proti extrémnímu metabolickému stresu by tak představovala důležitý pokrok ve vývoji nových terapeutik pro léčbu maligního melanomu.

V této práci jsem se zaměřila na cílenou inhibici metabolismu buněk maligního melanomu s mutacemi *BRAF* a *NRAS*. Z hlediska systémové terapie existuje více způsobů, jak ovlivnit metabolismus rakovinné buňky: lze jí zamezit přístup k živinám nebo zablokovat pomocí chemoterapeutik její vitální metabolické dráhy. V praktické části této práce jsem tyto dva přístupy propojila. Primárně jsem se věnovala ověření schopnosti buněk různého typu přežít extrémní metabolický stres vyvolaný inhibicí hlavních drah glukózového metabolismu *in vitro*. Přes četné informace o aktivovaných signálních drahách v melanomech s mutacemi *BRAF* a *NRAS* a dostupnost inhibitorů je totiž málo ověřených informací o chování a rezistenci těchto buněk při kombinované inhibici vícero klíčových funkcí.

Hlavním cílem bylo tedy objasnění **schopnosti buněk maligního melanomu přežít extrémní metabolický stres**. K dosažení tohoto cíle bylo nutné:

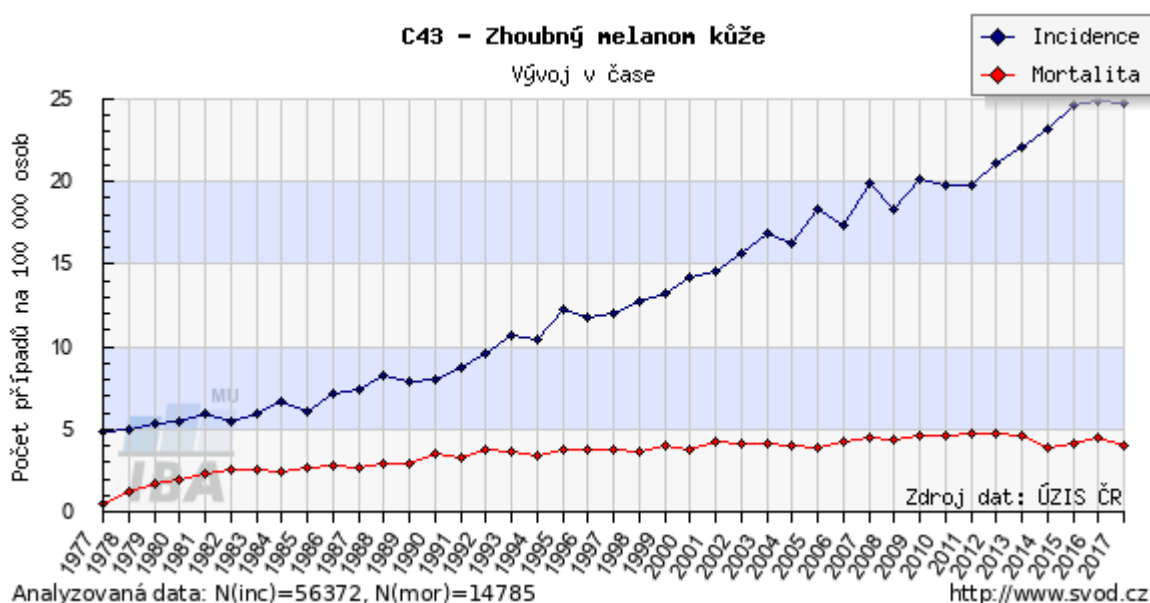
- zjistit životaschopnost nádorových buněk při absolutním zamezení přístupu živin
- zjistit životaschopnost nádorových buněk při inhibici hlavních drah energetického metabolismu
- analyzovat molekulární mechanismy umožňující přežití nádorových buněk.

Osobním cílem při provádění této práce bylo osvojit si základní laboratorní metody buněčné a molekulární biologie, seznámit se s vědeckou prací a jejími dílčími částmi: plánování a následné provádění experimentů, analýza výsledků, zpracování odborné literatury a obhajoba práce s diskuzí.

3 Teoretická část

3.1 Maligní melanom

Melanom je v současnosti nejzhubnějším karcinomem kůže s vysokou metastatickou schopností a jeho incidence roste rychleji než pro jakýkoli jiný typ solidního nádoru (Owens, 2014). Počet nových případů na světě se v roce 2012 pohyboval kolem 232 000, což představuje 2 % všech druhů rakoviny (Holmes, 2014). V České republice se vyskytlo v roce 2017 podle Národního onkologického registru 2120 nových případů zhoubného melanomu (obrázek 1).

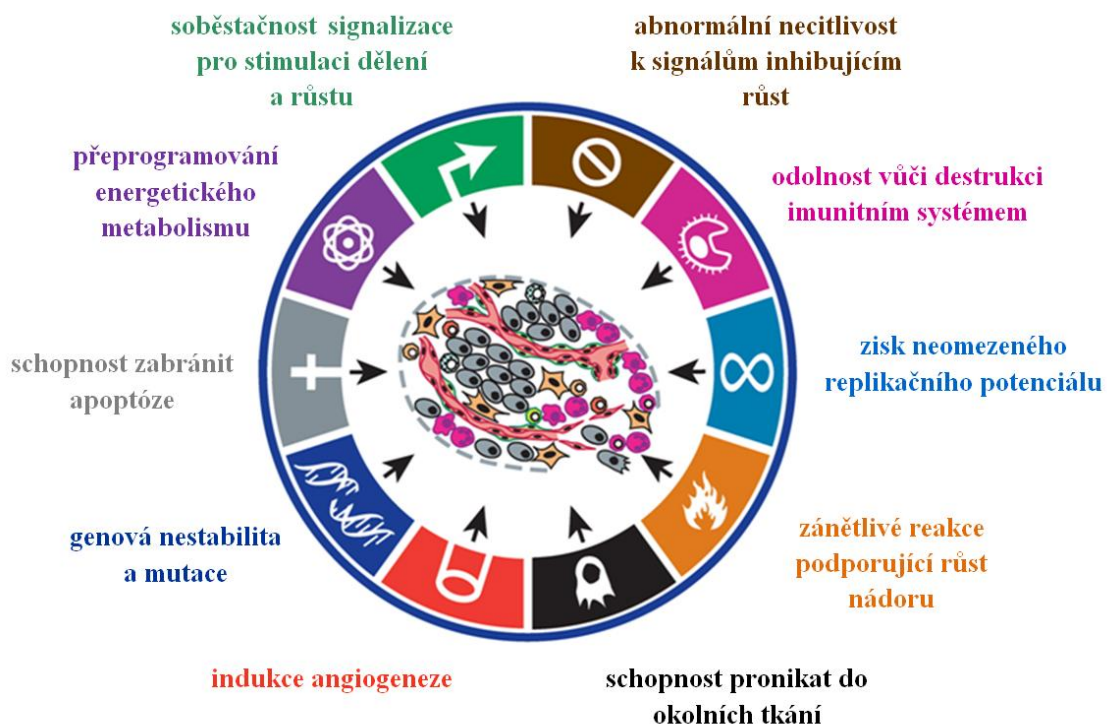


Obrázek 1: Časový vývoj výskytu a mortality maligního melanomu v ČR (SVOD Analýza, nedatováno).

V současnosti se maligní melanom léčí nejčastěji chirurgickou resekcí nádorového ložiska, radioterapií nebo chemoterapií. Přestože se terapeutické strategie výrazně zlepšily, onemocnění je stále vůči těmto metodám poměrně rezistentní (Ganguly *et al.*, 2012). Proto je naléhavě nutné objevit nové látky pro léčbu primárního melanomu stejně jako pro kontrolu metastáz. Jedním ze studovaných způsobů léčby nádorových onemocnění je cílení na jejich přeprogramovaný metabolismus, který představuje jeden z charakteristických znaků nádorových buněk.

Charakteristické znaky nádorových buněk

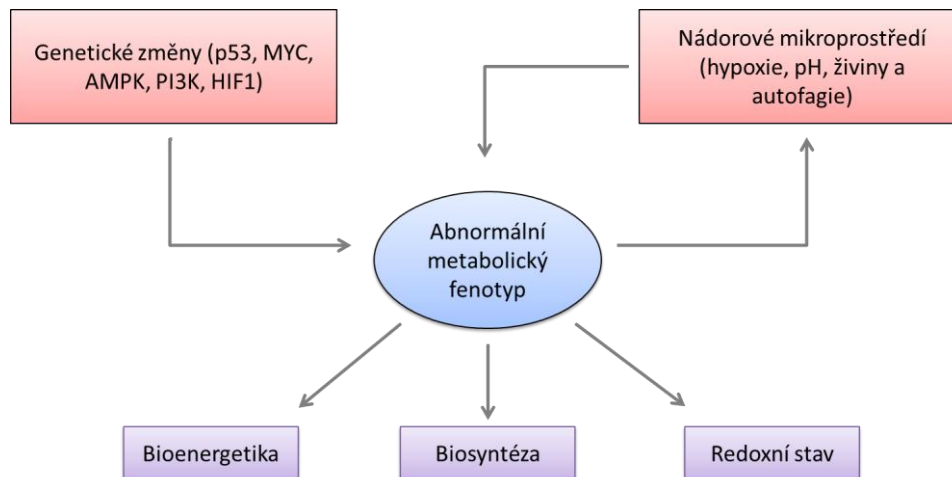
Hanahan a Weinberg (2000) poprvé definovali šest charakteristických znaků, kterými se nádorové buňky odlišují od buněk zdravých (obrázek 2). Patří mezi ně soběstačnost signalizace pro stimulaci dělení a růstu, abnormální necitlivost k signálům inhibujícím růst, schopnost zabránit apoptóze, získání neomezeného replikačního potenciálu, schopnost indukce angiogeneze (tvorba nových cév pro přísun živin a kyslíku) a schopnost pronikat do okolních tkání a tvořit sekundární nádory. V roce 2011 byl tento seznam stejnými autory doplněn ještě o další čtyři znaky, kterými jsou přeprogramování energetického metabolismu, odolnost vůči destrukci imunitním systémem, zánětlivé reakce podporující růst nádoru, genová nestabilita a mutace (Hanahan & Weinberg, 2011).



Obrázek 2: Charakteristické znaky nádorových buněk. Obrázek shrnuje deset charakteristických znaků nádorových buněk, které v roce 2011 shrnuli Douglas Hanahana a Robert Weinberg v článku „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“, převzato a upraveno.

3.2 Metabolismus nádorových buněk

Ke změně buněčného metabolismu přispívá více molekulárních mechanismů, které podporují tři základní potřeby pro dělení buňky: rychlá generace ATP pro udržení energetického stavu, zvýšená biosyntéza makromolekul a udržování buněčného redoxního stavu (obrázek 3).



Obrázek 3: Činitelé způsobující metabolický fenotyp nádoru. Metabolický fenotyp nádorových buněk je řízen vlastními genetickými mutacemi a vnějšími odpověďmi na mikroprostředí nádoru. Onkogenní signální dráhy řídící růst a přežití jsou často aktivovány ztrátou nádorových supresorů (jako je p53) nebo aktivací onkoproteinů (jako je PI3K). Výsledná změněná signalizace modifikuje buněčný metabolismus tak, aby odpovídal požadavkům buněčného dělení. Abnormální mikroprostředí jako je hypoxie, nízké pH nebo nedostatek živin ovlivňuje metabolickou aktivitu nádorových buněk a může vyvolat autofagii. Takové úpravy optimalizují metabolismus nádorových buněk pro proliferaci poskytováním potřebné energie ve formě ATP, biosyntézou prekurzorů a udržováním vyváženého redoxního stavu. (AMPK = AMP-aktivovaná proteinová kináza; HIF1 = faktor indukovaný hypoxií 1) (Cairns *et al.*, 2011, převzato a upraveno).

3.2.1 Normální a nádorová proliferace

Buňky savců neproliferují autonomně. Vstup normálních buněk do buněčného cyklu je striktně kontrolovaným procesem, který závisí na sousedních buňkách, chemických signálech v mikroprostředí a uvnitř samotné buňky. V normálních buňkách interagují extracelulární stimuly, jako jsou například růstové faktory, s odpovídajícím receptorem, aby zahájily intracelulární signalizační kaskádu, která může vyvolat dělení buňky. V rakovinných buňkách se však počet či aktivita receptorů růstového faktoru často zvyšuje v důsledku genetických mutací. Intracelulární signální dráhy podporující buněčnou proliferaci mohou být neustále aktivní také díky onkogenním mutacím proteinů rodiny RAS nebo RAF, jež jsou časté i v případě maligního melanomu (Vogelstein&Kinzler, 2004). Mutace *BRAF* byla prokázána u téměř 50 % případů kožního melanomu. Buňky s mutací *BRAF* se dělí nekontrolovatelně a stávají se odolnými vůči buněčné smrti. Nejčastější je mutace *BRAF*^{V600E}, při které se kinázová aktivita zvýší téměř pětsetkrát. Další četnou mutací je mutace *NRAS*, která se podle výzkumu vyskytuje u přibližně 20 % pacientů (Davis *et al.*, 2018).

Pro podporu kontinuální buněčné proliferace se zvyšují biosyntetické schopnosti nádorových buněk, včetně syntézy mastných kyselin a nukleotidů. Naopak proces β -oxidace mastných kyselin bývá potlačen. Tyto změny zvyšují metabolickou autonomii transformovaných buněk a umožňují jim posílit

anabolický fenotyp (Romero-Garcia *et al.*, 2011). Rychlá buněčná proliferace vyžaduje také přizpůsobení energetického metabolismu nádorových buněk za účelem uspokojení vysokých energetických a biosyntetických nároků (Jang *et al.*, 2013). Pozorujeme u nich zvýšenou aktivitu glykolýzy i za dostatku kyslíku, ačkoli mitochondriální dýchací řetězec spřažený se syntézou ATP je podstatně výhodnější (zisk ATP na mol glukózy je v poměru 2:36) (Heiden *et al.*, 2009a). To však nutně neznamená, že v nádorových buňkách oxidativní fosforylace neprobíhá nebo že by vždy měly poškozené mitochondrie. Tyto buňky nadále udržují v běhu mitochondriální citrátový (Krebsův) cyklus podporující syntézu prekurzorů pro různé biosyntetické pochody. Nádorové buňky se také často stávají závislými na příjmu aminokyseliny glutaminu z vnějšího prostředí, jehož metabolismus spojují s citrátovým cyklem. K porozumění energetickému metabolismu nádorových buněk je proto třeba pochopit význam metabolických drah glukózy, zejména glykolýzy a oxidativní fosforylace, a vliv metabolismu glutaminu.

3.2.2 Metabolismus glukózy

Glukóza je primárním zdrojem energie a je hlavním palivem pro buněčné dýchání savčích buněk. Za normálních podmínek poskytuje glykolýza dva moly pyruvátu, ATP a NADH na jeden mol spotřebované glukózy. V mitochondriích vstupuje pyruvát do Krebsova cyklu za vzniku NADH, donoru elektronů oxidativní fosforylace, což poskytuje 18krát více ATP než glykolýza. Kromě toho glukóza slouží jako zdroj uhlíku a glykolýza i citrátový cyklus poskytují metabolity používané jako stavební kameny pro biosyntézu makromolekul, které jsou potřebné pro buněčnou proliferaci (Heiden *et al.*, 2009a). Při využití glukózy za normálních podmínek je přibližně 70 % ATP produkováno oxidativní fosforylací a zbytek glykolýzou. Protože výtěžek ATP se mění s buněčnými podmínkami, poměr mezi glykolýzou a oxidativní fosforylací se také liší v různých buňkách, růstových stavech a mikroprostředí. Například při hypoxii kompenzuje zvýšená glykolýza zástavu oxidativní fosforylace, aby se udržela energetická rovnováha buněk. Ve většině nádorových buněk je i za přítomnosti kyslíku upřednostňována glykolýza navzdory funkčnímu mitochondriálnímu dýchání, proto je jejich metabolismus glukózy označován jako „aerobní glykolýza“ (též Warburgův efekt). I zdravé buňky, např. svalové buňky v hypoxických podmínkách nebo embryonální buňky, se však mohou přizpůsobit změnou energetického metabolismu, pokud je přísun kyslíku omezen nebo pokud by rychlost jejich růstu byla limitována dostupností některých živin. Tyto buňky přeměňují glukózu na laktát pro rychlejší, ale méně účinnou tvorbu ATP, která doprovází vysokou spotřebu glukózy.

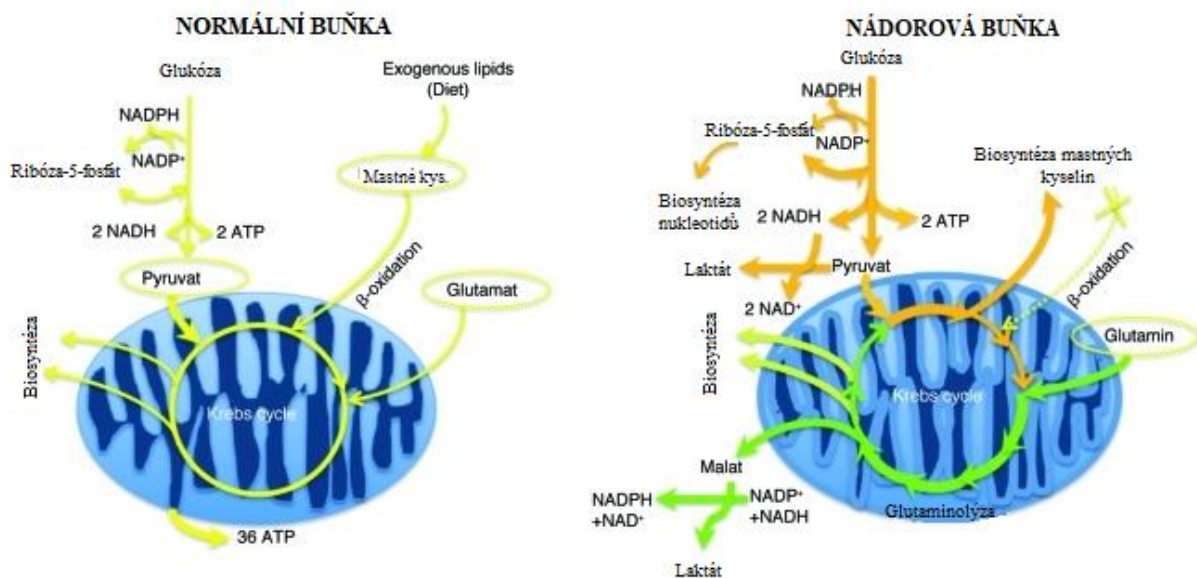
Produkce ATP v mitochondriích

Mitochondrie jsou orgány odpovědné za produkci buněčné energie. Na tyto buněčné elektrárny nahlížíme jako na důležité centrum metabolismu nádorové buňky, a tudíž i jako na cíl protinádorové terapie. Buněčná energie je zde produkována v procesu mitochondriálního dýchání (oxidativní fosforylace). Tento systém je založen na přenosu energie uskladněné v chemických vazbách, které buňka přijala jako živiny, do využitelné formy v podobě adenosintrifosfátu (ATP), kde je energie uložena ve formě fosfátových vazeb.

Součástí buněčného dýchání je i citrátový (Krebsův) cyklus, cyklus enzymatických reakcí lokalizovaný v mitochondriální matrix. Zde dochází k tvorbě redukovaných kofaktorů nezbytných k regeneraci ATP. Dále jsou v Krebsově cyklu vytvářeny metabolity, které slouží jako prekurzory pro syntézu aminokyselin, nukleotidů a lipidů. Vedle metabolických pochodů hraje mitochondrie důležitou roli v apoptóze, procesu programované buněčné smrti.

Centrem produkce ATP v mitochondrii je vnitřní mitochondriální membrána, na které probíhá oxidativní fosforylace. Skládá se ze dvou částí: respiračního řetězce (zajišťován proteinovými komplexy I-IV) a syntézy ATP (komplex V). Respirační řetězec přebírá elektrony z Krebsova cyklu a postupně je převádí na kyslík za vzniku vody. S přenosem elektronů jednotlivé komplexy respiračního řetězce pumpují protony (kationty vodíku) do mezimembránového prostoru mitochondrií. Nahromaděné protony vytváří elektrochemický gradient (membránový potenciál), který pohání ATP-syntázu k produkci výsledného ATP. Tato syntáza funguje jako miniaturní mitochondriální turbína, která je roztáčena protony proudícími zpět do matrix přes vnitřní mitochondriální membránu ve směru protonového gradientu (*Z topiče manažerem - Časopis Vesmír*, nedatováno; *Mitochondrie, nový cíl protirakovinné terapie - Časopis Vesmír*, nedatováno).

Dosud nebylo zcela objasněno, jakým způsobem mitochondrie detekují poruchy v produkci ATP. Dobře popsán je pouze mechanismus kontroly celkové hladiny ATP v buňce; zajišťuje ho proteinkináza aktivovaná adenosinmonofosfátem (AMPK), jejíž funkce bude blíže popsána v jedné z následujících kapitol.



Obrázek 4: Porovnání metabolismu nádorových a normálních buněk. Hlavní anaplerotické prekurzory v normálních a nádorových buňkách jsou uvedeny v elipsách. V nádorových buňkách podporuje glukóza buněčný růst prostřednictvím biosyntézy nukleotidů a lipidů. Asi 90 % ribózy-5-fosfát a 60 % mastných kyselin pochází z glukózy. Glutamin podporuje buňky prostřednictvím anaplerózy Krebsova cyklu a regenerace NADPH, doprovázené produkcí laktátu. Asi 60 % laktátu pochází z glutaminu (Heiden *et al.*, 2009, převzato a upraveno).

Warburgův efekt

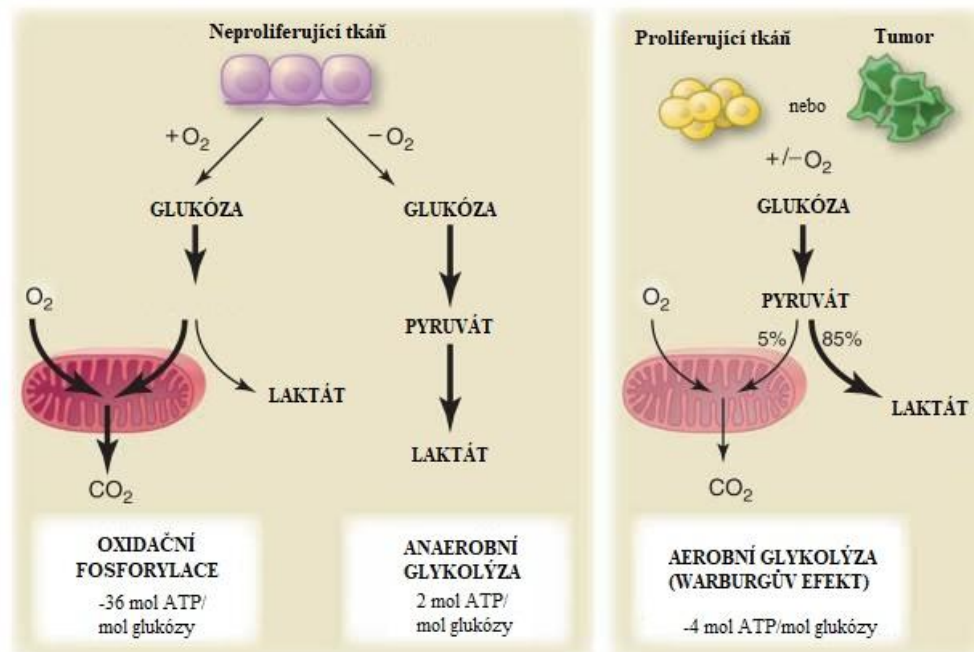
Již zmíněný Warburgův efekt je zjednodušeně řečeno zvýšený podíl glykolýzy na metabolismu glukózy i během normoxie a současně relativně snížená míra oxidativní fosforylace. Glukóza je zpracována aerobní glykolýzou v cytosolu a ve výsledku jsou z jedné molekuly glukózy během štěpení na pyruvát získány pouze dvě molekuly ATP oproti 36-38 molekulám, které by vznikly během oxidativní fosforylace (Heiden *et al.*, 2009a). I když je konečná bilance molekul ATP výrazně menší, glykolýza probíhá oproti oxidativní fosforylaci mnohem rychleji (Pfeiffer *et al.*, 2001). Proto se přeprogramování metabolismu na rychlou aerobní glykolýzu za účelem tvorby makromolekul nutných pro stavbu nových buněk zdá být velmi logickým krokem. Aby si však nádorová buňka zajistila dostatek potřebné energie, musí při přechodu na glykolýzu navýšit příjem glukózy. To zajišťuje zvýšená exprese glukózových transportérů (GLUT), pomocí nichž se glukóza transportuje bez spotřeby energie. Aktivaci jejich transportu k membráně zprostředkuje proteinkináza B (AKT) (Wieman *et al.*, 2007). Nejvýznamnější roli v nádorových buňkách hraje glukózový transporter 1 (GLUT1), jehož exprese se zvyšuje také při hypoxii (Souralová, 2016; Airley *et al.*, 2001).

Přechod nádorových buněk na glykolytický fenotyp je znám již desetiletí. Dlouho však nebyla známa příčina takto pozměněného metabolismu.

Ve své studii Otto Warburg (1956) původně předpokládal, že u rakovinných buněk dochází k defektu v mitochondriích, což vede k poškození aerobního dýchání a následnému spoléhání se na glykolytický metabolismus. Pozdější výzkumy však ukázaly, že mitochondriální funkce není u většiny rakovinných buněk narušena (Weinhouse, 1976; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007).

Dalším možným vysvětlením by mohla být schopnost nádorových buněk adaptovat se na hypoxické prostředí nádoru. I tento předpoklad se však později ukázal jako ne zcela přesný, neboť např. leukemické buňky přechází na aerobní glykolýzu, ačkoliv se nenachází v hypoxickém prostředí (Souralová, 2016; Elstrom *et al.*, 2004).

V současné době se předpokládá, že nádorové buňky přechází na aerobní glykolýzu nejen kvůli tvorbě ATP, nýbrž i za účelem produkce většího množství meziproductů glykolytického metabolismu jako stavebních kamenů pro biosyntetické pochody. V důsledku vyšší rychlosti glykolýzy je u nádorových buněk také nadbytek substrátu pro pentózofosfátový cyklus zpracovávající meziproduct glykolýzy, glukózu-6-fosfát, který využívají mimo jiné k tvorbě ribóza-5-fosfátu. To dává tumoru spolu s pozměněnou expresí některých enzymů značné výhody pro růst a proliferaci (Osuský, 2015; Murray&Davis, 2014). Právě produkce metabolitů má být za daných podmínek výhodnější než větší množství energie ve formě ATP, kterou by buňky získaly zpracováním glukózy pomocí oxidativní fosforylace (Heiden *et al.*, 2009b). Novější studie pak také ukazují, že pro nádorové buňky může být významným zdrojem ATP glutamin, jehož metabolity vstupují do Krebsova cyklu, a tím také může napomáhat oxidativní fosforylaci (Yang *et al.*, 2017).



Obrázek 5: Schematické znázornění rozdílů mezi oxidativní fosforylací, anaerobní glykolýzou a aerobní glykolýzou (Warburgův efekt). V přítomnosti kyslíku neproliferující (diferencované) tkáň nejprve metabolizují glukózu na pyruvát prostřednictvím glykolýzy a poté úplně oxidují většinu tohoto pyruvátu v mitochondriích na CO₂ během procesu oxidativní fosforylace. Protože kyslík je nutný jako konečný elektronový akceptor pro úplnou oxidaci glukózy, je pro tento proces nezbytný. Při nedostatku kyslíku umí buňky přeměňovat pyruvát získaný glykolýzou od mitochondriální oxidativní fosforylace produkci laktátu (anaerobní glykolýza). Tato generace laktátu během anaerobní glykolýzy umožňuje pokračování glykolýzy (oxidací NADH zpět na NAD⁺), ale vede k minimální produkci ATP ve srovnání s oxidativní fosforylací. Warburg pozoroval, že rakovinné buňky mají tendenci převádět většinu glukózy na laktát bez ohledu na to, zda je přítomen kyslík (aerobní glykolýza). Tuto vlastnost sdílí normální proliferující tkáň. Mitochondrie zůstávají funkční a v oxidačních buňkách i normálních proliferujících buňkách pokračuje oxidativní fosforylace. Nicméně aerobní glykolýza je pro výrobu ATP méně účinná než oxidativní fosforylace (Heiden *et al.*, 2009b, převzato a upraveno).

3.2.3 Glutamin

Glutamin je nejhojnější aminokyselina v krevní plazmě. Závislost nádorových buněk na glutaminu je považována za jeden z jejich charakteristických znaků. Jak již bylo popsáno dříve, pro nádorové buňky je také charakteristický Warburgův efekt, kdy dochází k dysregulaci glukózového metabolismu. V normálních buňkách s dostatečným přísunem živin se glukóza mění na pyruvát a dále acetyl-CoA, který je hlavním prekurzorem pro syntézu mastných kyselin. Uhlíkové atomy zde dodává primárně glukóza, částečně však i glutamin. Nádorové buňky s glykolytickým fenotypem však spotřebovávají většinu glukózy na tvorbu laktátu, a proto je přísun glukózy do cyklu trikarboxylových kyselin (TCA) výrazně omezen. Nádorové buňky se proto stávají závislými na glutaminu jako zdroje uhlíkových atomů v TCA. Když vstupuje glutamin do TCA, enzym glutamináza (kódovaný geny GLS1 a GLS2) jej přeměňuje na glutamát (Mates *et al.*, 2013). Z něj následně vzniká alfa-ketoglutarát. Jednotlivé meziproducty TCA buď slouží jako stavební kameny pro syntézu stavebních molekul (např. aminokyselin) nebo jsou využity pro syntézu ATP (Souralová, 2016). Vzhledem k tomu, že GLS2 je asociován se zvýšenými hladinami glutathionu, může hrát důležitou roli při regulaci energetického metabolismu buněk a jejich ochraně před oxidativním stresem. Glutathion je významný antioxidant, který může vzniknout z glutamátu. Uplatňuje se při odstraňování volných kyslíkových radikálů, které jsou hojně produkovány rakovinnými buňkami vlivem pozměněného metabolismu (Choi&Park,

2018). Dále inhibuje růst tumoru a jeho exprese byla u některých druhů nádorů snížena (Osuský, 2015).

3.2.4 Role onkogenů a nádorových supresorových genů

Primárními faktory ovlivňujícími metabolismus v rakovinných buňkách je nádorové mikroprostředí, aktivace onkogenů a inaktivace nádorových supresorových genů. Část heterogenity metabolismu pozorované u nádorů lze připsat mikroprostředí nádoru. Nerovnoměrná distribuce krevních cév může vést ke gradientu živin, pH a kyslíku a tyto rozdíly podporují metabolické přeprogramování u vybraných buněk, které jsou přizpůsobeny takovému prostředí. Pozměnění metabolismu je také podporováno několika dobře charakterizovanými onkogeny, jako jsou PI3K, AKT, c-Myc, BRAF, RAS, isocitrátdehydrogenáza 1 a 2 (IDH1 a IDH2), a inaktivací nádorových supresorů, jako jsou p53 a LKB1 (Carnero *et al.*, 2008). K nejvýznamnějším signálním drahám řídících růst a přežívání nádorových buněk patří PI3K/AKT/HIF-1 α a Ras/Raf/MEK/ERK, které budou dále popsány.

Signální dráha PI3K/AKT/HIF-1 α

Tato signální dráha patří mezi nejčastěji deregulované drhy v kancerogenezi. Mutacemi genu PI3K velmi často vznikají onkogeny a jednou z prvních identifikovaných mutací nádorového supresorového genu je mutace genu PTEN, který dráhu PI3K/AKT vypíná (Li *et al.*, 1997; Maehama&Dixon, 1998).

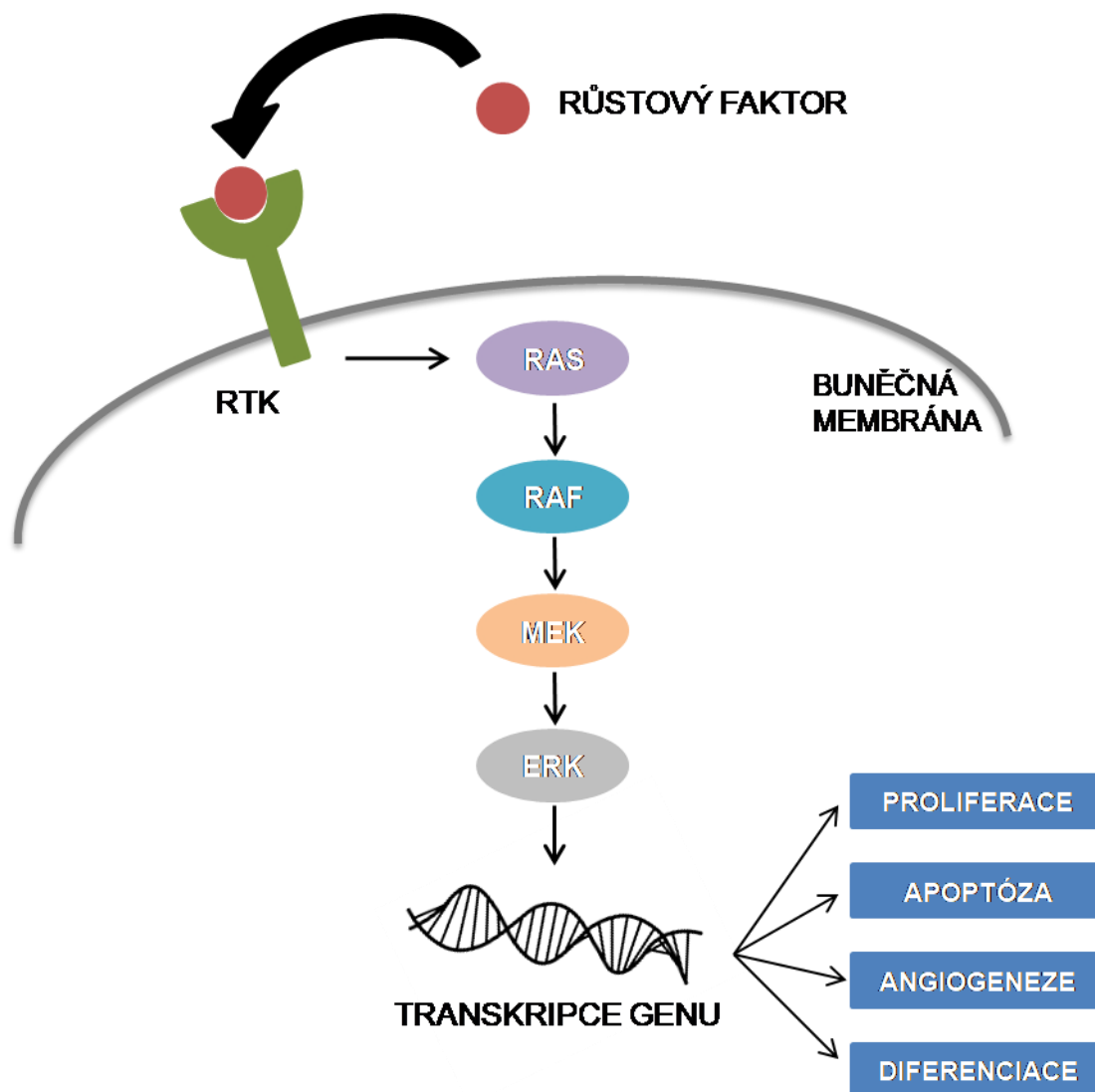
Fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K) aktivuje signál z receptorových tyrozinkináz (RTK) nebo signál z receptorů asociovaných s G-proteinem (GPCR). PI3K dále fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP₃), který následně aktivuje proteinkinázu B (AKT) (Carnero *et al.*, 2008). AKT ve zdravých buňkách ovlivňuje buněčný růst, dělení buněk, apoptózu, metabolismus glukózy či proteosyntézu (Masopust&Průša, 2003). V nádorových buňkách může dojít k mutaci genu pro PI3K, což může vést k nekontrolovatelné aktivaci této kinázy, a tudíž i nadměrné aktivitě AKT (Osuský, 2015).

Aktivace PI3K podněcuje změnu buněčného metabolismu. Zvýšená aktivita PI3K poskytuje stimulační signály pro glykolýzu prostřednictvím membránové translokace glukózových transportérů a fosforylace klíčových glykolytických enzymů, např. hexokinázy či fosfofruktokinázy 2 (Cairns *et al.*, 2011).

RAS/RAF/MEK/ERK

Tato další často mutovaná dráha je typickým představitelem signálních cest z rodiny drah kináz aktivovaných mitogeny (MAPK). MAPK je aktivována jako odpověď na řadu mimobuněčných signálních molekul a růstových faktorů. Reguluje především buněčný růst, proliferaci, migraci buněk, diferenciaci a apoptózu. Tyto procesy jsou výsledkem aktivace kaskády signálních proteinů RAS/RAF/MEK/ERK (McCubrey *et al.*, 2007).

K aktivaci této signální dráhy dochází po navázání signální molekuly, jako je růstový faktor, cytokin nebo mitogen, na patřičný RTK, z něhož vznikne enzymaticky aktivní dimer (obrázek 6). Po dimeraci receptoru aktivovaný RAS váže GTP a přemísťuje faktor asociovaný s RAS k membráně, kde také dochází k jeho dimerizaci a aktivaci. RAS může prostřednictvím různých proteinů aktivovat více různých signálních drah. U zde popisované dráhy se jedná o kinázu RAF. Ta je zodpovědná za fosforylaci dvou serinových zbytků další kinázy MEK. Protein MEK dále fosforyluje kinázu regulovanou extracelulárním signálem (ERK). Mutace některého genu kódujícího protein účastnící se této kaskády může vést k nadměrné aktivaci ERK, která stimuluje různé transkripční faktory (McCubrey *et al.*, 2007).



Obrázek 6: Signální dráha RAS/RAF/MEK/ERK (zdroj: autor)

3.2.5 Cílení na metabolismus nádorových buněk

Převážná většina metabolických drah, na které se rakovinné buňky spoléhají, je běžná i pro normální buňky, a tak teoreticky není vhodná pro cílenou protinádorovou terapii. Nicméně je možné cílit na pozměněnou aktivitu signálních drah nebo nádorově specificky mutované metabolické proteiny. Ve své práci jsem používala inhibitory signálních drah a metabolických enzymů.

3.2.5.1 Cílení na signální dráhy regulující metabolismus

Nádorová terapie, která cílí na řídicí onkogeny nevrací přeprogramovaný metabolismus zpět kompletně. Pokud však lépe pochopíme důsledky inhibice onkogenů pro buněčný metabolismus, budeme moci navrhnout efektivní kombinovanou léčbu. Jako příklad lze uvést inhibitory BRAF a MEK, které v buňkách s mutací *BRAF* podporují expresi PGC1 α (peroxisomový proliferátorem aktivovaný receptor gama koaktivátor 1-alfa), vedoucí k posílení biogeneze mitochondrií a zvýšení oxidativní fosforylace (Haq *et al.*, 2013; Miniotis *et al.*, 2013). To naznačuje, že kombinovaná léčba za použití inhibitorů BRAF nebo MEK spolu s inhibitory oxidativní fosforylace by mohla představovat atraktivní terapeutickou možnost. Bylo též prokázáno, že dva inhibitory mitochondriálního komplexu I, phenformin a metformin, zvyšují terapeutickou účinnost inhibitorů BRAF v melanomu, zpožďují získanou rezistenci na BRAF inhibitory *in vitro* a indukují regresí nádoru v myších modelech (Niehr *et al.*, 2011). Kromě toho upřednostňují rezistentní buňky s mutací *BRAF* metabolismus glutaminu před glukózou, což naznačuje, že kombinací inhibitorů BRAF s inhibitory metabolismu glutaminu by bylo možné cíleně léčit rezistentní buňky nebo přinejmenším oddálit vznik rezistence (Hernandez-Davies *et al.*, 2015; Baenke *et al.*, 2016). Mezi klíčové signální dráhy ovlivňující metabolismus buňky patří také dráhy kináz AMPK a PIKfyve.

Kináza AMPK

Kináza aktivovaná adenosinmonofosfátem (AMPK) se nachází ve všech eukaryotických buňkách a pro svou schopnost udržovat energetickou homeostázu je často nazývána energetickým senzorem. Pokud se buňka ocitne v metabolickém stresu (např. při nedostatku glukózy nebo kyslíku) a spotřebovává více energie, dochází ke zvýšení poměru AMP:ATP, a v důsledku toho k aktivaci AMPK (Hardie, 2011). Reakcí na změnu hladiny ATP je pak fosforylace substrátů, která potlačuje procesy anabolické (syntézu proteinů, mastných kyselin a glykogenu) a podporuje procesy katabolické (zvýšená spotřeba glukózy, glykolýza, oxidace mastných kyselin, autofagie atd.) za účelem nastolení energetické rovnováhy. Mimoto se tento protein podílí na regulaci buněčných procesů zahrnujících biogenezi mitochondrií či proliferaci buněk (Koždoňová, 2019). Regulátorem této kinázy je nádorový supresor LKB1, který bývá mutován u některých druhů nádorů (Shaw *et al.*, 2004).

Teprve před několika lety Faubert *et al.* (2013) objasnili souvislost mezi Warburgovým efektem (přechodem na glykolýzu) a proteinkinázou aktivovanou AMP. Její deregulace vede k aktivaci transkripčních faktorů mTOR a HIF1, s tím spojeným přechodem na glykolytický fenotyp, dále zvýšené syntéze lipidů z molekul glukózy a produkci dalších stavebních látek, což se projevuje rychlejším růstem nádoru. Nejčastější mutace v buňkách melanomu *BRAF*^{V600E} účinně inhibuje dráhu AMPK (Zheng *et al.*, 2009). Je zajímavé, že byly prokázány synergické účinky inhibitorů BRAF s aktivátory AMPK (metformin, phenformin, AICAR) při léčbě melanomu (Zheng *et al.*, 2009; Livingstone *et al.*, 2015).

Kináza PIKfyve

Klíčovými složkami membránového transportního a signalizačního aparátu v eukaryotických buňkách jsou proteiny, které vážou nebo syntetizují fosfoinositidy. Fosfatidylinositol-3-fosfát 5-kináza (PIKfyve) je lipidová kináza, která fosforyluje fosfatidylinositol-3-fosfát (PI3P) za vzniku fosfatidylinositol 3,5-bisfosfátu [PtdIns(3,5)P₂] nebo fosfatidylinositol 5-fosfátu (PtdIns5P). Předpokládá se, že PtdIns(3,5)P₂ a PtdIns5P jsou zapojeny do několika buněčných funkcí, včetně vezikulárního transportu, aktivace iontových kanálů a signalizace receptoru epidermálního růstového faktoru (Takasuga&Sasaki, 2013; McCartney *et al.*, 2014a). Řada pokusů navíc naznačuje, že se PIKfyve podílí na onkogenezi a migraci rakovinných buněk (Ikonomov *et al.*, 2013a; Oppelt *et al.*, 2014a), a ukázalo se, že ztráta funkce PIKfyve vede ke zvětšení pozdních endozomálních nebo lysozomálních váčků a výrazné cytoplazmatické vakuolizaci. Příčinou je pravděpodobně narušení zpracování endozomů (Ikonomov *et al.*, 2001; Shisheva, 2001; Nicot *et al.*, 2006). Endocytóza se významně podílí na příjmu živin z vnějšího prostředí, a proto není překvapivé, že cílené snížení hladiny PIKfyve vedlo i k významnému snížení migrace rakovinných buněk (Oppelt *et al.*, 2014a). Inhibice aktivity PIKfyve pomocí inhibitoru YM201636 vedla ke značnému snížení buněčné proliferace u více druhů rakoviny (Dupuis-Coronas *et al.*, 2011a). Také se ukázalo, že snížení exprese pomocí siRNA nebo inhibice PIKfyve pomocí inhibitorů indukuje sekreční autofagii ve více buněčných liniích (Hessvik *et al.*, 2016; Sano *et al.*, 2016). Sekreční autofagie je typ autofagie, který usnadňuje sekreci cytozolových proteinů, které se nemohou účastnit běžného sekrečního mechanismu přes endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. V této práci byl zkoumán terapeutický potenciál inhibice PIKfyve v terapii melanomu.

3.2.5.2 Cílení na metabolické enzymy

Některé z protinádorových léčiv se zaměřují na specifické metabolické potřeby rakovinných buněk. Patří k nim např. léčiva zaměřená na metabolismus folátů: 5-fluorouracil (5-FU) a methorexát, jež narušují syntézu nukleotidů a DNA. 5-FU cílí na thymidylátsyntázu a methorexát na dihydrofolátreduktázu (Verlande *et al.*, 2018).

Pro buňky s mutací *RAS* neexistuje zatím žádná cílená terapie a současnou strategií je cílení na dráhy aktivované mutovaným proteinem *RAS*. Je zajímavé, že *GLUT1*, kódující glukózový transportér-1, je jedním z několika genů, které jsou systematicky nadměrně exprimovány v buňkách s mutacemi *KRAS* (Yun *et al.*, 2009). Proto se zdají být inhibitory *GLUT1* (phloretin, WZB117) nebo glykolýzy dobrou volbou pro terapii nádorů s mutacemi *RAS*. Navíc se ukázalo, že inhibitory glykolýzy přednostně potlačují růst buněk s mutací *KRAS* (Clem *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2009).

Mnoho inhibitorů glykolýzy prochází v současné době preklinickým nebo klinickým testováním na několik typů rakoviny. Jedním z nich je analog glukózy 2-deoxy-D-glukóza (2DG). 2DG je fosforylována hexokinázami, což vede k produkci 2DG-6-fosfátu (2DG-6P). 2DG-6P nemůže být dále metabolizován, hromadí se v cytosolu a inhibuje hexokinázy jako součást negativní zpětné vazby (Wick *et al.*, 1957). 2DG podporuje zastavení růstu a apoptózu v nádorových buňkách (Aft *et al.*, 2002) a zesiluje účinky standardní cytotoxické chemoterapie (Kaplan *et al.*, 1990; El Mjiyad *et al.*, 2011a). Mimoto 2DG snižuje produkci ATP zpomalením glykolytického toku a může aktivovat dráhu AMPK. Terapeutickým omezením 2DG je však toxicita této látky (Mohanti *et al.*, 1996), což by mohl pomoci překonat vývoj selektivnějších a specifitějších inhibitorů. Na druhé straně vede inhibice glykolýzy často ke zvýšení glutaminolýzy, aby se kompenzovala snížená produkce ATP. Léčba cílicí na glykolýzu tak může mít za následek vysokou spotřebu glutaminu v nádoru, čímž by došlo ke

snížení jeho dostupnosti v tukové a svalové tkáni a následnému úbytku hmotnosti (kachexii) (Deberardinis&Cheng, 2010; Verlande *et al.*, 2018).

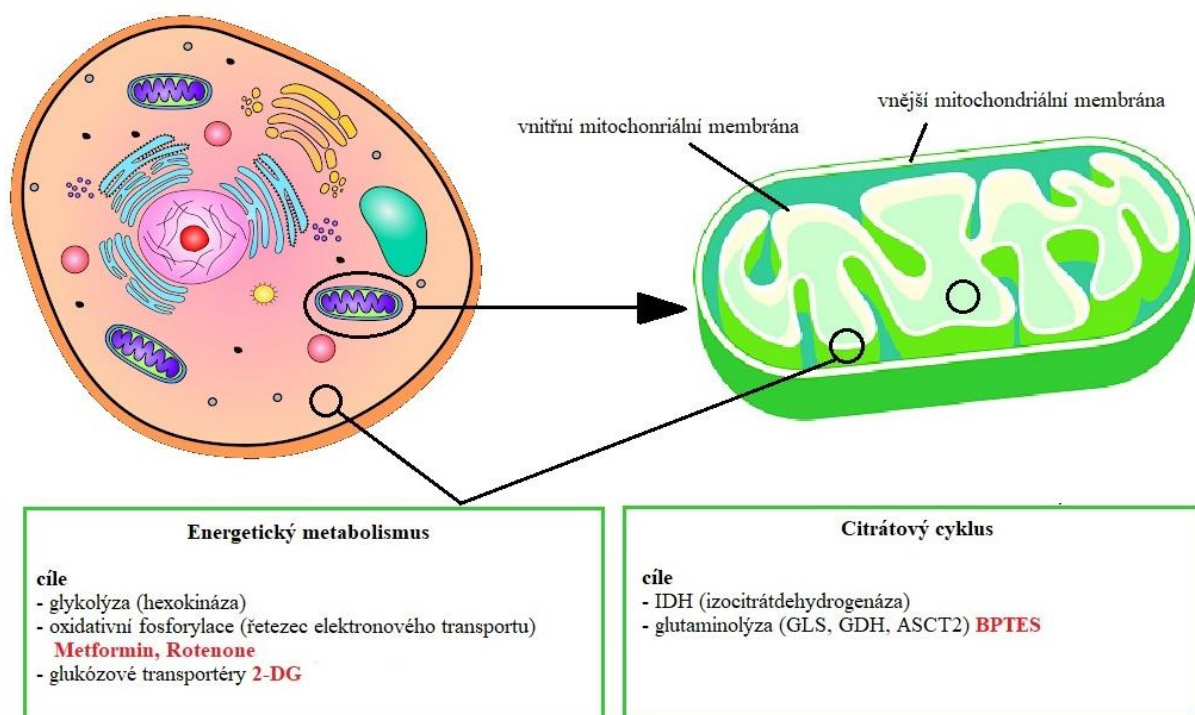
Kromě glykolýzy jsou i jiné metabolické dráhy atraktivním cílem pro léčbu nádorových onemocnění. Buněčná proliferace vyžaduje kvůli syntéze membrán a signálních molekul dostatek mastných kyselin (MK). Omezená dostupnost MK tak může kontrolovat proliferaci rakovinných buněk a podobně jako u metabolismu glukózy může být cílením na metabolismus MK selektivnější pro vysoce proliferující buňky. Na metabolismus MK lze cílit dvěma způsoby; buď inhibicí syntézy MK nebo zvýšením mitochondriální β -oxidace MK. Mezi enzymy podílející se na produkci MK z cytosolického citrátu patří ATP citrát lyáza, acetyl-CoA karboxyláza, syntáza mastných kyselin a acyl-CoA syntetázy. Inhibice kteréhokoli z těchto enzymů snižuje syntézu MK a byla prokázána jako účinná léčba v preklinickém testování (Walsh&Bar-Sagi, 2001; Nagarajan *et al.*, 2016).

Zvýšení mitochondriální β -oxidace MK může snížit dostupnost MK pro biosyntetické pochody, ale použití této strategie má různé výsledky. Ve skutečnosti může zvýšená oxidace MK podporovat u některých nádorů proliferaci rakovinných buněk tím, že zvýší hladinu ATP a oxidativní fosforylace podporou přeměrování MK do mitochondrie, jejich rozpadem na acetyl-CoA a jeho opětovným vstupem do Krebsova cyklu. Dále se ukázalo, že oxidace MK je zásadní pro přežití rakovinných buněk při stresových podmínkách (Zaugg *et al.*, 2011). Kromě toho snížení syntézy MK prostřednictvím inhibice acetyl-CoA karboxylázy (ACC) nepřímo podporuje β -oxidaci MK, protože přímý produkt ACC, malonyl-CoA, negativně ovlivňuje aktivitu karnitin palmitoyl transferázy 1 (CPT1), která transportuje MK do mitochondrií pro oxidaci.

3.2.6 Mitochondrie

3.2.6.1 Změněné funkce mitochondrií a jejich využití v cílené terapii nádorových onemocnění

Při vzniku a vývoji nádoru dochází k adaptaci řady buněčných funkcí novým potřebám transformované buňky a podstatnými změnami prochází i mitochondrie. Tato organela se může namísto pouhé produkce ATP také významně podílet na biosyntetických procesech a značný podíl energie tak musí nádorové buňky získávat glykolýzou i v aerobním prostředí (viz. kapitola 3.2.2 Metabolismus glukózy). Změny ve fungování mitochondriálních procesů (mutace a změny v expresi enzymů citrátového cyklu, inhibice vnitřní dráhy apoptózy, apod.) mohou značně ovlivňovat životaschopnost a chování buněk a jsou charakteristické pro nádorové buňky. To vedlo k myšlence cílit protinádorovou terapii na tuto organelu. V současné době proto probíhá výzkum možností ovlivnění jednotlivých mitochondriálních procesů, mezi které patří apoptická signalizace, energetický metabolismus, citrátový cyklus a také oxidačně-redukční rovnováha nádorových buněk (Krejčíř *et al.*, 2018). Já jsem se ve své práci zaměřila na inhibici některých drah energetického metabolismu a citrátového cyklu (obrázek 7).



Obrázek 7 Přehled vybraných strategií pro cílení mitochondriálních procesů v terapii nádorů Červeně jsou vyznačeny použité látky inhibující dané mitochondriální procesy (Krejčíř *et al.*, 2018, převzato a upraveno).

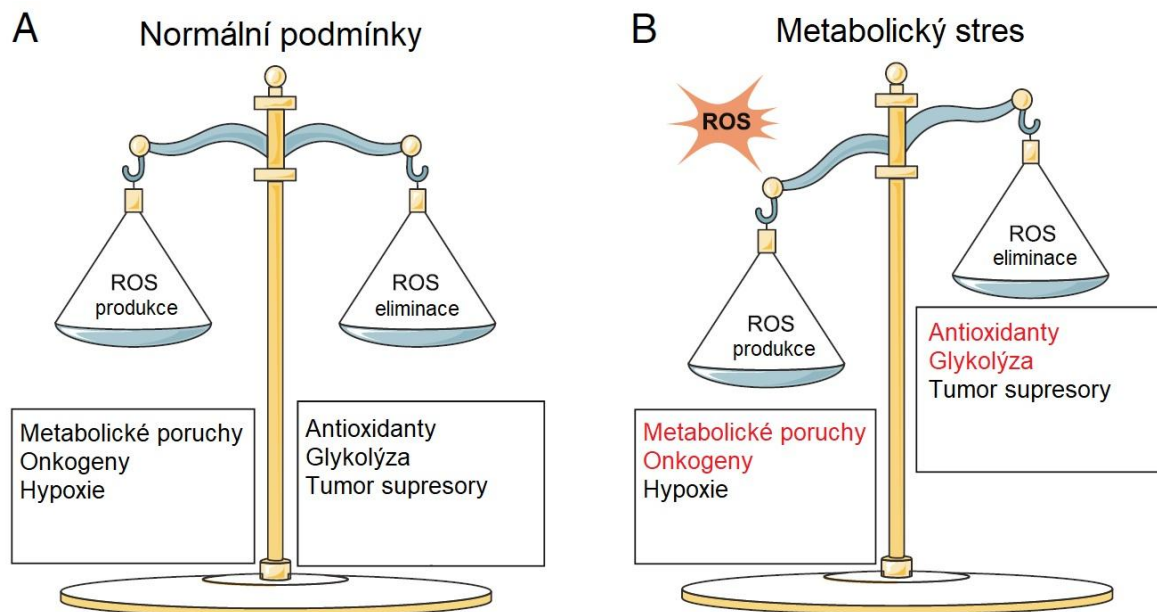
3.3 Metabolický stres a signalizace kyslíkových radikálů

Důsledkem aberantní proliferace a relativně nedostatečné angiogeneze a vaskularizace je metabolický stres, který je charakterizován nedostatkem živin, kyslíku a růstových faktorů (Jin&White, 2007). Jednou z forem metabolického stresu je nedostatek glukózy, jakožto hlavního energetického zdroje v nádorových buňkách. Odhaduje se, že koncentrace glukózy v nádorech může být tři až desetkrát nižší než ve zdravých tkáních (Vincent *et al.*, 2015). Tento nedostatek živin přímo snižuje tvorbu ATP a vede k nadprodukcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) (Panieri&Santoro, 2016).

ROS představují heterogenní soubor vysoce reaktivních forem kyslíku, které obsahují nepárový valenční elektron. Vznikají přirozeně jako vedlejší produkt mitochondriální oxidativní fosforylace, metabolismu kyslíku a funkcí NADH/NADPH oxidázy.

Mnoho nádorových buněk trvale vykazuje vysoké hladiny reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v důsledku genetických a metabolických změn nebo změn souvisejících s mikroprostředím (Druker *et al.*, 2006). Mitochondrie rakovinných buněk mohou produkovat vyšší hladiny peroxidu vodíku (H_2O_2) a superoxidového aniontu (O_2^-) v porovnání s normálními buňkami (Szatrowski&Nathan, 1991). U rakovinných buněk došlo k vytvoření antioxidačních mechanismů, které působí proti ROS, což zvyšuje jejich životaschopnost. Různé studie naznačily, že rychlá glykolyza, tj. Warburgův efekt a pentózofosfátový cyklus, by mohly snižovat tvorbu O_2^- a H_2O_2 , za podmínky, že by se buňky spoléhaly méně na mitochondriální oxidativní fosforylaci (Elstrom *et al.*, 2004; Gatenby&Gillies, 2004).

Při metabolickém stresu je však redoxní rovnováha porušena. Limitní zásoby glukózy narušují glykolýzu a dochází též ke snížení produkce NADPH v důsledku méně využitého pentózofosfátového cyklu (Ahmad *et al.*, 2005). Nedostatek glukózy vede ke zvýšení tvorby energie mitochondriemi. Ve výsledku se metabolismus přesouvá z glykolýzy směrem k oxidativní fosforylaci, čímž dochází k nadměrné produkci ROS (Moleyv&Mueckler, 2000). Nerovnováha tvorby ROS a odstraňování ROS vede ke stresu (obrázek 8), jenž dále aktivuje apoptotické dráhy (Zhao *et al.*, 2017).



Obrázek 8 Redoxní stav buňky je určen produkcí a eliminací ROS. **A** Za normálních podmínek udržují nádorové buňky redoxní homeostázu vyvažováním produkce a eliminace ROS. **B** Při metabolickém stresu je redoxní homeostáza porušena zvýšenou produkcí ROS a sníženou eliminací ROS (Aft *et al.*, 2002, převzato a upraveno).

4 Materiál

Praktická část této práce byla provedena na pracovišti Biologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

4.1 Buněčné linie

V experimentech byly použity následující buněčné linie:

A375

z maligního melanomu kůže 54leté ženy
mutace *BRAF*^{V600E}
epiteliální typ buňky
adherentní linie
získány z Evropské kolekce buněčných kultur (ECACC)
kultivační médium: RPMI

MelJuso

z primárního nádoru melanomu 58leté ženy
mutace *NRAS*
epiteliální typ buňky
adherentní linie
získány z Německé sbírky mikroorganismů a buněk (DSMZ)
kultivační médium: RPMI

U2OS

osteosarkom
epiteliální typ buňky
adherentní linie
získány z Evropské kolekce buněčných kultur (ECACC)
kultivační médium: RPMI

hFF-1

fibroblasty
epiteliální typ buňky
adherentní buňky
zdroj: ATCC
kultivační médium: DMEM

4.2 Složení roztoků

Název roztoku	Složení
1× PBS (PhosphateBufferedSaline)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
TBS-Tween	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 0,05% Tween 20
2× nanášecí pufr	1M Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, glycerol, β-mercaptoethanol, 0,01% bromophenol blue
10% separační gel (2 kusy)	2,7 ml H ₂ O, 2,8 ml 1M Tris-HCl pH 8,8, 75 μl 10% SDS, 20 μl 10% APS, 5 μl TEMED, 1,88 ml 40% akrylamid
5% zaostřovací gel (2 kusy)	2,8 ml H ₂ O, 469 μl 1M Tris-HCl pH 6,8, 37,5 μl 10% SDS, 18,75 μl 10% APS, 3,75 μl TEMED, 469,4 μl 40% akrylamid
10× elektroforetický pufr	144,2 g 200mM glycin, 30,3 g 1M Tris-HCl, 1000 ml H ₂ O
1× elektroforetický pufr	100 ml 10× elektroforetický pufr, 10 ml 10% SDS, 890 ml H ₂ O
1× přenosový pufr	100 ml 10× elektroforetický pufr, 200 ml 25% methanol, 700 ml H ₂ O
ECL roztok A	200 mM Tris-HCl (pH 9,4), 0,5 mM EDTA, 405 μM kyselina parakumarová, 10 mM luminol, 4 mM 4-jodofenylboritá kyselina
ECL roztok B	50 mM octan sodný (pH 5,0), 0,5 mM EDTA, 8 mM perboritan sodný

Tabulka 1: Používané roztoky a jejich složení

4.3 Seznam protilátek

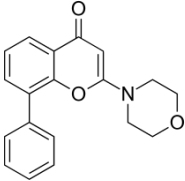
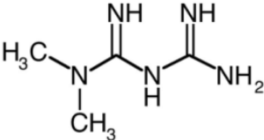
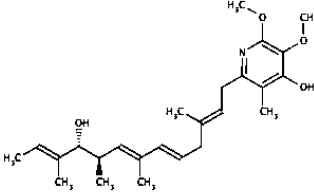
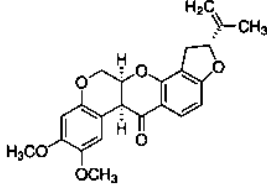
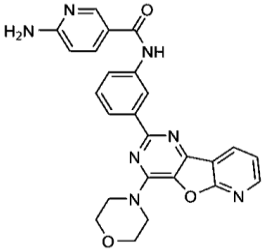
Název/katalogové číslo	Detekovaný protein	Velikost proteinu	Původ	Ředění	Zdroj
p-AMPK α (40H9) (#2535)	Fosfo-AMPK α	62 kDa	kryší monoklonální protilátka	1:2000	Cell Signaling Technology
PIP5KIII (64-Q6) (sc-100408)	PIP5KIII / PIKFYVE	262 kDa	myší monoklonální protilátka	1:500	Santa Cruz Biotechnology
PC10 (supernatant z buněčné kultury)	PCNA	36 kDa	myší monoklonální protilátka	1:50	RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc., MOÚ v Brně

Tabulka 2: Seznam primárních protilátek použitých při analýze exprese proteinů

4.4 Chemikálie

V experimentech byly použity následující chemikálie pro vyvolání buněčného stresu (tabulka 3).

Název	Charakteristika
2-deoxy-D-glukóza	inhibitor glykolýzy rozpuštědlo: DMSO použitá koncentrace: 5 mM zdroj: MedChemExpress
APY0201	selektivní inhibitor PIKfyve rozpuštědlo: DMSO použitá koncentrace: 0,1 μ M zdroj: Cayman Chemical
BPTES	selektivní inhibitor glutaminázy GLS1 rozpuštědlo: DMSO použitá koncentrace: 10 μ M zdroj: Sigma-Aldrich
Dorsomorphin	inhibitor AMPK rozpuštědlo: DMSO použitá koncentrace: 10 μ M zdroj: MedChemExpress

<p>LY294002</p>	<p>inhibitor PI3K rozpuštědlo: DMSO použitá koncentrace: 25 μM zdroj: Cell Signalling Technology</p>	
<p>Metformin</p>	<p>inhibitor mitochondriálního komplexu I rozpuštědlo: DMSO použitá koncentrace: 5 mM zdroj: Sigma-Aldrich</p>	
<p>Piericidine A</p>	<p>inhibitor mitochondriálního komplexu I rozpuštědlo: DMSO použitá koncentrace: 0,5 μM, 1 μM zdroj: Santa Cruz Biotechnology</p>	
<p>Rotenon</p>	<p>inhibitor elektronového transportního řetězce rozpuštědlo: DMSO použitá koncentrace: 5 μM zdroj: MedChemExpress</p>	
<p>YM201636</p>	<p>selektivní inhibitor PIKfyve rozpuštědlo: DMSO použitá koncentrace: 2 μM zdroj: SelleckChem</p>	

Tabulka 3: Seznam použitých chemikálií pro vyvolání buněčného stresu

5 Metody

5.1 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie jsem kultivovala v Petriho misce v médiu RPMI 1640 obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (Gibco), 2 mM L-glutamin (PAA), 100 IU/ml penicilin (PAA) a 100 µg/ml streptomycin (PAA). Konstantní prostředí kultivace zajišťoval sterilní inkubátor, který má stálou teplotu 37 °C a 5 % CO₂ v atmosféře.

Dle rychlosti růstu buněčné linie jsem buňky 2-3 × týdně pasážovala sterilně v laminárním boxu. Po odsátí starého média byly buňky promyty roztokem 1 × PBS. Z povrchu misky jsem buněčnou kulturu uvolila roztokem trypsin-EDTA a buňky jsem inkubovala v inkubátoru po dobu 2-5 minut. Poté jsem trypsin-EDTA inaktivovala přidávkem média s FBS. Potřebné množství buněčné suspenze jsem dala do Petriho misky s čerstvým ohřátým médiem.

5.2 Průtoková cytometrie

Pro stanovení životaschopnosti buněk jsem použila metodu průtokové cytometrie. Výhodou této metody je provádění analýzy vlastností na úrovni jednotlivých buněk ve vzorku o velkém počtu buněk během velmi krátkého časového úseku.

Pro měření životaschopnosti jsem nasadila na kultivační misku takové množství buněk, aby měly v den měření životaschopnosti 70-80% konfluenci. Pro měření životaschopnosti po 48 h od ošetření buněk příslušnými testovanými látkami se tedy jednalo o 70 000 buněk/1 ml na šestijamkové desce. Po nasazení jsem buňky inkubovala 24 h při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂. Další den jsem přidala látku testované na schopnost inkubovat buněčnou smrt a inkubovala dalších 48 h.

Adherentní buňky jsem po promytí roztokem 1 × PBS uvolnila od kultivačního povrchu pomocí roztoku trypsin-EDTA a sklídila do zkumavek. Jelikož mrtvé buňky volně plavou, centrifugoval jsem je při 1200 rpm/5 min. Po centrifugaci jsem odsála supernatant a přidala 0,4 ml 1 × PBS.

Ke stanovení životaschopnosti buněk jsem používala fluorescenční barvivo propidium jodid (PI; Sigma-Aldrich), do každé zkumavky jsem těsně před měřením přidávala 1 µl PI. Četnost živých a mrtvých buněk byla stanovena sledováním intenzity fluorescence na průtokovém cytometru. Princip této metody spočívá v tom, že PI se váže na DNA v jádrech pouze u odumřelých buněk, které mají porušenou cytoplazmatickou membránu.

K měření jsem používala cytometr Cytomics FC 500 (BeckmanCoulter, Inc., Fullerton, CA, USA); (kanál FL3, emisní vlnová délka 620 nm) a data byla analyzována pomocí CXP Software (BeckmanCoulter, Inc., Fullerton, CA, USA).

V každém zkoumaném vzorku bylo změřeno minimálně 10 000 buněk a parametry analýzy byly nastaveny tak, aby z celkové kvantifikace byly vyloučeny buněčné debris.

5.3 Detekce proteinů pomocí Western blot analýzy

Pro detekci proteinů ve vzorcích jsem používala polyakrylamidovou elektroforézu a westernový přenos. Metoda je tvořena třemi základními kroky: 1. elektroforetickou separací proteinů (SDS-PAGE), 2. westernovým přenosem separovaných proteinů na PVDF membránu, 3. detekcí proteinů za použití primárních a sekundárních protilátek.

5.3.1 Příprava lyzátů pro elektroforézu

Buněčná suspenze byla sterilně nasazena na 6, resp. 12jamkové, desce v množství $1,5 \times 10^6$ buněk/jamku, resp. $0,75 \times 10^6$ buněk/jamku, 24 h před ovlivněním. Po ovlivnění byly buňky dále kultivovány potřebnou dobu za standardních podmínek. Před lyzí byly buňky dvakrát promyty nesterilním roztokem $1 \times$ PBS a do každé jamky bylo napipetováno 250 μ l $2 \times$ nanášecího pufru pro SDS-PAGE, čímž došlo k lyzi buněk a denaturaci buněčných proteinů. Vzniklá směs byla přenesena do předem připravených mikrozkuvek a centrifugována při 1200 rpm/5 min. Hotové lyzáty byly následně pro úplnou denaturaci proteinů zahřívány v termobloku 15 minut na teplotu 95 °C, případně zmrazeny při -20 °C pro pozdější použití.

5.3.2 Příprava polyakrylamidových gelů

Pro SDS-PAGE byla použita kombinace dvou polyakrylamidových gelů lišících se obsahem akrylamidu (AA) a pH. Horní úsek tvořil tzv. zaostřovací gel o nízké koncentraci AA a nízkém pH (6,8), v dolním úseku byl tzv. separační gel o vyšším pH (8,8) a vyšší koncentraci AA. Vhodnou koncentrací AA v separačním gelu lze ovlivňovat velikost pórů gelu a tím optimální rozdělení proteinů o určité velikosti. Se zvyšující se koncentrací těchto látek se póry gelu stávají menšími a gel se hodí pro separaci menších molekul. Pro detekci p-AMPK (molekulová hmotnost 62 kDa) byly připraveny separační gely o 10% koncentraci AA, pro detekci PIK-fyve (molekulová hmotnost 262 kDa) jsem zvolila separační gel s 6% AA.

Gely jsem připravovala v aparatuře firmy HoeferSmallMighty SE250. V prvním kroku jsem namíchala roztok separačního gelu, který jsem zalila 1 ml 70% ethanolu pro zarovnání povrchu gelu. Po 20-25 min gel zpolymerizoval, po odsátí ethanolu jsem do aparatury napipetovala roztok pro zaostřovací gel a nasadila hřebínek. Po uplynutí dalších 20 min byly polyakrylamidové gely připraveny k použití.

5.3.3 SDS-PAGE

Princip této metody spočívá v separaci denaturovaných proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Díky přidavku SDS jsou proteiny záporně nabitě a putují od záporného pólu ke kladnému. Rychlost jejich migrace je dána právě jejich molekulovou hmotností.

Skla s připraveným gelem jsem umístila do elektroforetického stojanu a nalila mezi ně $1 \times$ elektroforetický pufr. Po zahřátí vzorků jsem nanasla 20 μ l vzorku do jamek v polyakrylamidovém gelu. Do jedné jamky v gelu jsem nanasla 1 μ l proteinového markeru (Prestained Protein LadderMarkerBluestar) $20 \times$ ředěného nanášecího pufru. Proteiny byly separovány při počátečním konstantním napětí 60 V. Poté, co prošly zaostřovacím gelem, jsem napětí postupně navýšovala do 95 V. Elektroforéza se provádí do té doby, dokud nedojde k vhodné separaci zkoumaného proteinu (poznáme podle viditelného proteinového markeru).

5.3.4 Elektroforetický přenos proteinu (western blotting)

Proteiny se z gelu přenášejí na membránu elektroforetickým přenosem, tj. působením elektrického proudu. Při tomto procesu putují stále negativně nabitě proteiny vhodně orientovaným elektrickým polem z gelu na membránu, kde jsou díky její protein-vazebné schopnosti zachyceny v naprosto identickém rozložení jako v gelu.

Přístroj zajišťující přenos se skládá ze soustavy ploché anody a katody (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell; BioRad). Na anodu jsem položila filtrační papír navlhčený v 1 × přenosovém pufru. Poté jsem na něj přiložila polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu aktivovanou v methanolu, gel a další filtrační papír. Anodu jsem překryla druhou elektrodou (katodou) a zapojila ke zdroji s konstantním proudem (0,11 A na 1 membránu po dobu 1 h 15 min). Po ukončení přenosu jsem promyla membránu v destilované vodě.

5.3.5 Vizualizace proteinů fixovaných na membráně

PVDF membrána má vysokou afinitu k proteinům, tedy i k protilátkám. Proto jsem po přenosu proteinu z gelu použila k blokaci membrány roztok 5% odtučněného sušeného mléka v TBS-Tween. Tímto je zajištěno specifické navázání protilátky k jejímu cílovému antigenu na vzorku. Membránu jsem inkubovala na třepačce po dobu 1 h při pokojové teplotě.

V dalším kroku jsem membránu nařezala podle pozice zkoumaných proteinů. Na proužky s příslušnými proteiny jsem nanasla primární protilátku a nechala inkubovat přes noc při teplotě 4 °C. Primární protilátka se naváže na svůj antigen, je-li přítomen mezi separovanými proteiny na membráně. Následující den jsem membránu promyla 4 × 7 min v TBS-Tween. Po promytí jsem přidala sekundární protilátku s navázanou křenovou peroxidázou, tj. protilátku proti primární protilátce, a inkubovala 1 h při pokojové teplotě. Poté jsem membránu opět promyla 4 × 7 min v TBS-Tween.

Sekundární protilátku jsem díky přítomnosti křenové peroxidázy detekovala metodou ECL (*enhanced chemiluminescence*) s použitím systému G:Box Chemi XRQ (Syngene). Roztok pro ECL jsem připravila smícháním roztoku A a B v poměru 1:1. Ten jsem poté nanasla na membrány umístěné na antireflexní desce uvnitř přístroje a zahájila expozici. Množství detekovaného proteinu odpovídá intenzitě exprese světelného signálu, který vzniká reakcí křenové peroxidázy a chemilumiscenčního substrátu. Pro kontrolu, že všechny vzorky v gelu obsahují stejné množství lyzátu, jsem vždy detekovala také množství proteinu PCNA, jehož hladina by se neměla výrazněji měnit.

5.4 Imunofluorescence a konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskop jsem užila pro jeho vyšší rozlišovací schopnost danou detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Uspořádání mikroskopu též umožňuje získání trojrozměrného obrazu řezu rovinou.

Fázově kontrastní mikroskopie je technika optické mikroskopie, která přeměňuje fázové změny vlnění vzniklé po průchodu fázovým objektem na změny intenzity světla. Samotné fázové posuny jsou neviditelné, ale při zobrazení jasu se stanou viditelnými. Vlnění přímé a difrakční lze oddělit, což je velmi významné, protože to umožňuje regulovat amplitudu a fázi světla přímého bez ovlivnění světla difrakčního a naopak.

Pro vytvoření mikroskopických preparátů jsem použila adherentní buňky. Nasadila jsem je na 12jamkové desky, do kterých jsem předem vložila sterilní mikroskopická sklíčka. Po 24h inkubaci při 37 °C a 5 % CO₂ v atmosféře jsem buňky ovlivnila inhibitory a kultivovala požadovanou dobu v inkubátoru. Před samotným pozorováním je potřeba buňky zafixovat. Nejprve jsem buňky promyla 2 × 3 min v 1 × PBS. Dále jsem buňky zafixovala přidavkem 0,5 ml 3% paraformaldehydu (Sigma-Aldrich) a inkubovala 10 min při pokojové teplotě. Poté jsem preparáty opět promyla 2 × 3 min v 1 × PBS a zafixované buňky jsem permeabilizovala pomocí 0,2% roztoku TritonX-100 (Sigma-Aldrich) v 1 × PBS. Pokud byly cílem detekce cytoplazmatické proteiny, preparáty jsem v permeabilizačním roztoku inkubovala po dobu 5 minut a pokud byly cílem detekce jaderné proteiny, činila inkubační doba 10 minut. Následně jsem vzorky 1 h blokovala v roztoku 1% BSA (Serva) v 1 × PBS a poté přes noc inkubovala s primární protilátkou naředěnou v 1% BSA v 1 × PBS při 4 °C. Další den jsem preparáty opět třikrát promyla 1 × PBS a při pokojové teplotě inkubovala se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenčním barvivem naředěnou v roztoku 0,05% Tween (Sigma-Aldrich) a 1% BSA v 1 × PBS po dobu 1 hodiny. Preparáty jsem po inkubaci se sekundární protilátkou jedenkrát promyla 1 × PBS a inkubovala v roztoku interkalačního barviva DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol; Sigma-Aldrich) v 1 × PBS po dobu 5 minut. Barvivo DAPI o koncentraci 1 µg/ml bylo využito pro značení jader buněk, jelikož silně váže oblasti DNA bohaté na adenin a thymin. Vzorky jsem poté opět třikrát promyla 1 × PBS a byly připraveny výsledné preparáty za využití montovacího média VectaShield (VectorLaboratories). Analýzu subcelulární lokalizace proteinů ve vzorcích jsem provedla na konfokálním mikroskopu (LSM 700 Laser Scanning Microscope, Carl Zeiss Microscopy) a na export a úpravu dat jsem použila software Image Browser ZEN LE (Carl Zeiss Microscopy).

5.5 Zpracování dat

Všechny výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v programu *GraphPad Prism*. Z dat získaných opakováním tří nezávislých experimentů byl určen aritmetický průměr a směrodatná odchylka (*standard error of the mean*, S.E.M.). Statistická významnost byla určena pomocí Studentova t-testu. Její hladina byla stanovena P<0,05 *, P<0,01 ** a P<0,001 ***.

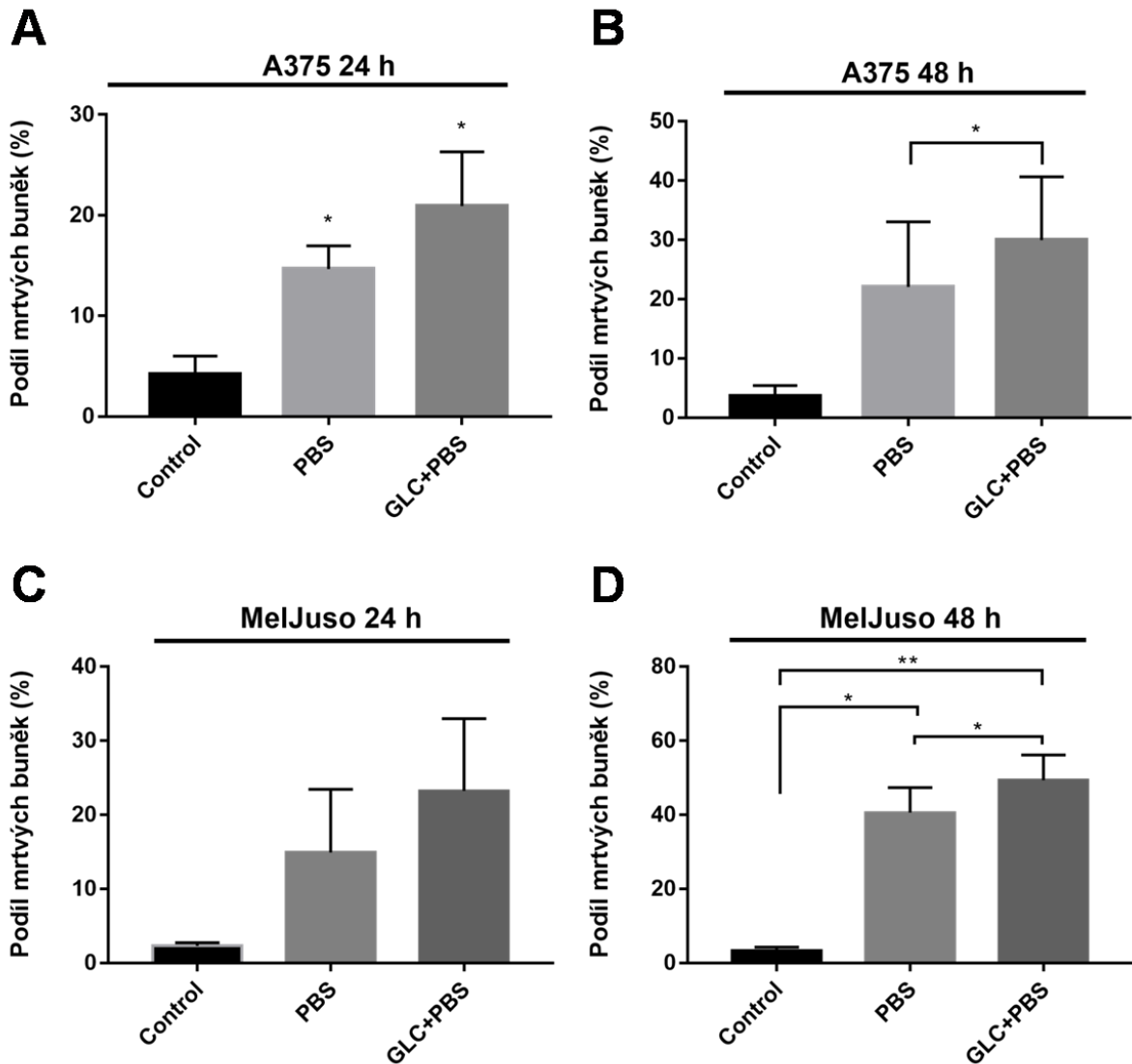
6 Výsledky

6.1 Buňky linie A375 a MelJuso jsou odolné vůči extrémnímu metabolickému stresu

Cílem mé práce bylo charakterizovat mechanismy, které umožňují nádorovým buňkám přežít metabolický stres. Prvním krokem bylo zjistit odolnost buněk maligního melanomu linie A375 (mutace *BRAF*^{V600E}) a MelJuso (mutace *NRAS*) vůči extrémnímu metabolickému stresu, tedy stavu, kdy buňky nemají přístup k žádným živinám. Tento stav jsme navodili kultivací buněk v PBS (viz. kapitola 4. 2 Složení roztoků). Dále jsem zkoumala chování buněk v médiu s přidanou glukózou, která představovala v daných podmínkách jediný zdroj živin pro nádorové buňky.

Buňky obou linií jsem kultivovala po dobu 24 h a 48 h v roztoku 1× PBS (PBS) a ve stejném roztoku s přidáním glukózy o koncentraci 2 mM (GLC+PBS). Jako negativní kontrolu jsem použila médium RPMI, ve kterém byl rozpuštěn roztok glukózy. Následně jsem pomocí fluorescenčního barviva Propidium jodid (dále jen PI) a průtokové cytometrie stanovila životaschopnost buněk.

U obou linií maligního melanomu překvapivě neměl extrémní nedostatek živin (kultivace v PBS) po dobu 24 h výrazný vliv na jejich životaschopnost (obrázek 9A, 9C). Po 48h kultivaci v PBS už došlo k výraznějšímu nárůstu podílu mrtvých buněk, stále však přežívala u obou linií více než polovina buněk (obrázek 9B, 9D). Dalo by se předpokládat, že za přístupu glukózy bude přežít větší procento buněk, neboť je známo, že tato živina představuje spolu s glutaminem hlavní hlíkový zdroj pro růst nádorových buněk, a tudíž jsou na ní závislé (viz. kapitola 3.2 Metabolismus nádorových buněk). Je proto překvapivé, že za přítomnosti glukózy umíralo ve všech čtyřech případech větší procento buněk v porovnání s extrémními podmínkami, kdy neměly buňky žádné živiny. Buňky A375 byly vůči nedostatku živin odolnější než buňky MelJuso, přičemž u obou linií došlo u 48h inkubace k nárůstu podílu mrtvých buněk oproti 24h inkubaci.



Obrázek 9: Odolnost buněk linie A375 a MelJuso vůči extrémnímu metabolickému stresu. Buňky maligního melanomu linie A375 a MelJuso jsem kultivovala po dobu 24 h a 48 h v roztoku 1 × PBS (PBS) a ve stejném roztoku s přidavkem glukózy o koncentraci 2 mM (GLC+PBS) a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI. Jako negativní kontrolu jsem použila DMSO. Grafy znázorňují průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování, které jsou vyjádřeny jako procentuální podíl mrtvých buněk. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$. Control=negativní kontrola (RPMI), PBS=roztok 1 × PBS, GLC+PBS=roztok 2 × PBS s přidavkem 2mM glukózy (zdroj: autor).

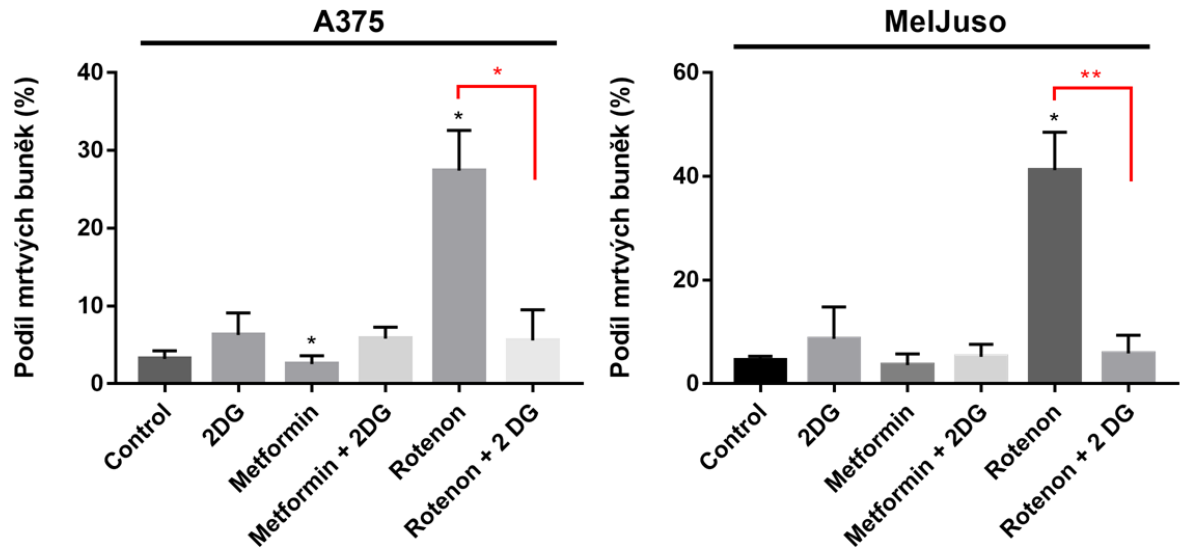
6.2 BRAF^{V600E} i NRAS-mutantní buňky se dokážou vyrovnat s metabolickým stresem vyvolaným současnou inhibicí glykolýzy a oxidativní fosforylace

V dalším kroku nás zajímalo, jak se buňky dokážou vyrovnat se stresem vyvolaným inhibicí hlavních metabolických drah. Vybrali jsme proto tři metabolické stresory, které cílí na klíčové kroky v glykolýze a oxidativní fosforylaci, dvě hlavní buněčné dráhy energetického metabolismu. Pro inhibici glykolýzy jsme vybrali inhibitor hexokinázy 2-deoxy-D-glukózu (2DG), který v současné době prochází klinickým testováním ve fázi I/II pro léčbu několika typů rakoviny. Tento glukózový analog zvyšuje oxidativní stres, inhibuje N-vázanou glykosylaci a vyvolává autofagii. Může též účinně zpomalit růst buněk a potenciálně usnadnit apoptózu v určitých nádorových buňkách (Aft *et al.*, 2002). Pro inhibici oxidativní fosforylace jsme zvolili dva inhibitory mitochondriálního komplexu I, rotenon a metformin. Mitochondriální komplex I (NADH dehydrogenáza) katalyzuje oxidaci NADH na NAD⁺ a zároveň transfer dvou elektronů na koenzym Q nazývaný též ubichinon. Rotenon byl vybrán pro svou specifčnost a dobře charakterizovaný mechanismus účinku, zatímco metformin byl vybrán, protože se jedná o léčivo standardně klinicky využívané v terapii diabetu 2. typu. Vyšší úroveň metabolického stresu jsme se pak rozhodli vyvolat kombinací těchto metabolických stresorů, které zasáhnou různé dráhy metabolismu buněčné energie.

Výsledky předchozích experimentů naší laboratoře naznačovaly, že současná inhibice oxidativní fosforylace a glykolýzy chrání buňky před účinky extrémního metabolického stresu. Proto jsme se rozhodli ověřit toto pozorování a porovnali vliv inhibice zmíněných metabolických drah na životaschopnost buněk A375 a MelJuso.

Buňky obou linií jsem kultivovala po dobu 48 h v přítomnosti inhibitorů 2-deoxy-D-glukóza (2DG) o koncentraci 5 mM, metformin o koncentraci 5 mM a rotenon o koncentraci 5 μ M. Jako negativní kontrolu jsem použila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek. Poté jsem využila metodu průtokové cytometrie a pomocí fluorescenčního barviva PI jsem změnila životaschopnost buněk.

Ukázalo se, že 2DG, metformin a jejich kombinace nevykazují výraznou toxicitu vůči buňkám A375 a MelJuso (Obrázek 10). Je však zajímavé, že současné ošetření 2DG s rotenonem zlepšilo životaschopnost obou buněčných linií v porovnání se samotným účinkem rotenonu. Tímto byl potvrzen dříve pozorovaný ochranný efekt 2DG vůči toxicitě vyvolané rotenonem.

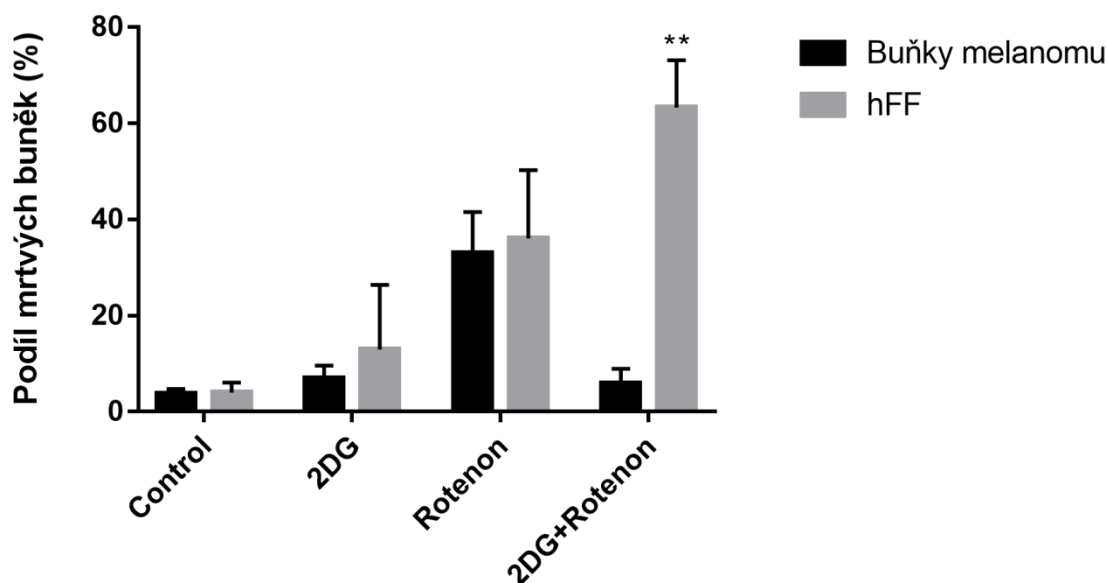


Obrázek 10: BRAF^{V600E} i NRAS-mutantní buňky se dokážou vyrovnat s metabolickým stresem vyvolaným současnou inhibicí glykolýzy a oxidativní fosforylace. Grafy znázorňují procentuální podíl mrtvých buněk po 48h kultivaci v přítomnosti inhibitoru glykolýzy 2-deoxy-D-glukózy (2DG; 5 mM), inhibitorů oxidativní fosforylace metforminu (5 mM) a rotenonu (5 μ M) a jejich kombinaci. Životaschopnost buněk byla stanovena pomocí průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI. Grafy znázorňují průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$. Černě oproti kontrole, červeně oproti rotenonu (zdroj: autor).

6.3 2DG nemá ochranný účinek na životaschopnost normálních buněk ošetřených inhibítorem mitochondriálního komplexu I

Dále nás zajímalo, zda normální buňky reagují na metabolický stres vyvolaný současnou inhibicí mitochondriálního komplexu I a hexokinázy podobně jako nádorové buňky. Proto jsem ošetřila lidské fibroblasty předkožky (hFF – human foreskin fibroblasts) inhibítorem mitochondriálního komplexu I rotenonem o koncentraci 5 μM , inhibítorem hexokinázy 2-deoxy-D-glukózou (2DG) o koncentraci 5 mM a jejich vzájemnou kombinací. Následně jsem po 48h kultivaci stanovila životaschopnost buněk pomocí fluorescenčního barviva PI a průtokové cytometrie. Jako negativní kontrolu jsem použila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek.

Zatímco hFF reagují na metabolický stres vyvolaný inhibicí samotné oxidativní fosforylace nebo inhibicí samotné glykolýzy podobně jako nádorové buňky, vzájemná kombinace 2DG s rotenonem vykazuje cytotoxický efekt na rozdíl od buněk melanomu. Současná inhibice mitochondriálního komplexu I a hexokinázy měla výrazně vyšší toxický účinek na hFF, ochranný efekt 2DG se tedy u normálních buněk ošetřených rotenonem neprojevil (Obrázek 11).



Obrázek 11: Porovnání ochranného účinku 2DG na lidské fibroblasty předkožky (hFF) ošetřené rotenonem a na buňky melanomu ošetřené rotenonem (A375 a MelJuso). Buňky byly kultivovány po dobu 48 h v přítomnosti inhibitoru hexokinázy 2-deoxy-D-glukózy (2DG; 5 mM), inhibitoru mitochondriálního komplexu I rotenonu (5 μM) a jejich vzájemné kombinaci. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO (Control). Následně byla stanovena životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI. Hodnoty v grafu ukazují průměrné hodnoty procentuálního podílu mrtvých buněk ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol ** představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,01$ (zdroj: autor).

6.4 Inhibitory metabolických drah 2DG a rotenon aktivují AMPK

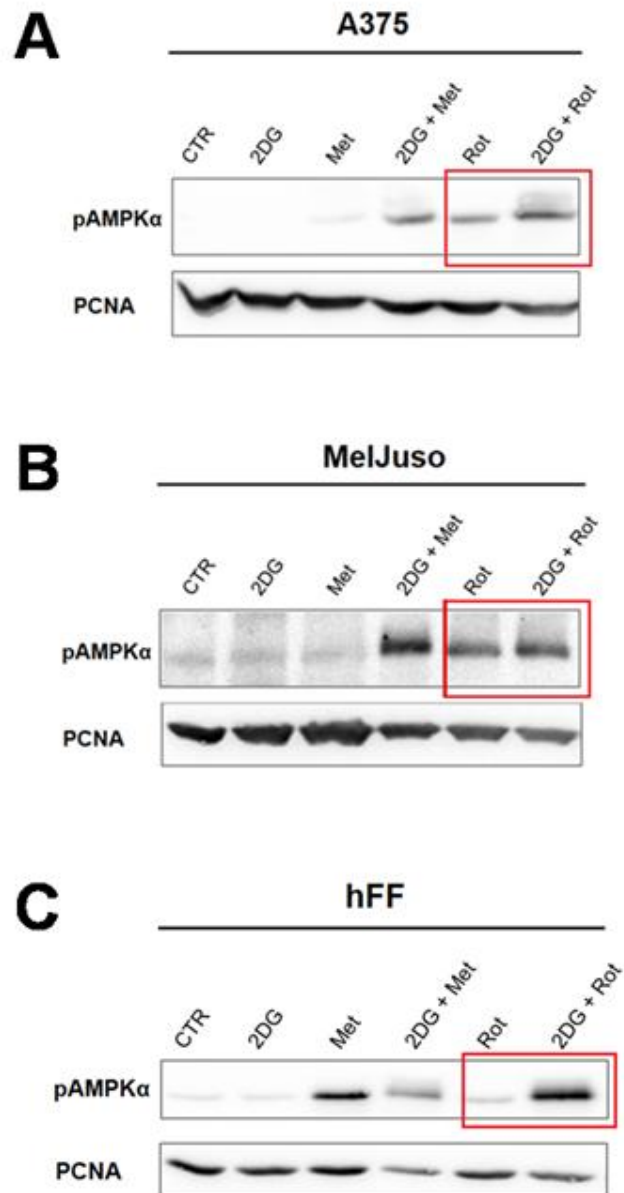
Dalším cílem bylo blíže charakterizovat mechanismus chránící nádorové buňky před smrtí při současné inhibici glykolýzy a oxidativní fosforylace. Jelikož kináza aktivovaná adenosinmonofosfátem (AMPK) je protein, který se aktivuje při zvýšení poměru AMP:ATP (tj. když buňka spotřebovává více energie), zajímalo nás, jestli metabolický stres bude ovlivňovat její aktivitu. K sledování tohoto procesu jsme pomocí Westernového přenosu detekovali fosforylaci AMPK α (pAMPK α), která činí tuto kinázu aktivní.

Detekci tohoto proteinu jsem provedla pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) ve spojení s Westernovým přenosem. Buňky tří linií (MelJuso, A375 a hFF) jsem kultivovala s testovanými látkami po dobu 16 h. Zkoumala jsem vliv inhibitoru hexokinázy 2DG (5 mM), inhibitorů oxidativní fosforylace metforminu (5 mM), rotenonu (5 μ M) a jejich kombinací na buňky melanomových linií A375 a MelJuso a lidské fibroblasty předkožky (hFF). Jako negativní kontrolu jsem použila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek. Pro ověření, že v jednotlivých vzorcích je skutečně stejné množství proteinu, jsem detekovala protein PCNA (jaderný antigen proliferujících buněk). PCNA je protein nezbytný pro replikaci v eukaryotických buňkách a jeho hladina by se v buňkách v průběhu krátkodobého experimentu neměla výrazněji měnit.

Z obrázku 12 plyne, že se AMPK aktivuje u buněk melanomových linií A375 a MelJuso až po aplikaci 2DG a metforminu, rotenonu nebo při současném působení 2DG a rotenonu. V návaznosti na předchozí výsledky nás zajímala fosforylace pAMPK α především po současné aplikaci 2DG a rotenonu v porovnání s účinkem samotného rotenonu. Jelikož u buněk A375 lze při současné inhibici oxidativní fosforylace a glykolýzy pozorovat zvýšenou aktivitu tohoto energetického senzoru (obrázek 12A), lze předpokládat, že buňky této linie přežívají po současné aplikaci 2DG a rotenonu díky aktivaci AMPK. U buněk MelJuso naproti tomu nebyla pozorována výrazně vyšší hladina pAMPK α při současné inhibici oxidativní fosforylace a glykolýzy (obrázek 12B), ochranný mechanismus 2DG vůči buňkám MelJuso ošetřených inhibitorem mitochondriálního komplexu I tak zůstává nejasný.

Stejný pokus jako s nádorovými buňkami jsem provedla s normálními lidskými fibroblasty předkožky hFF, u kterých se v předchozím pokusu neprokázal ochranný účinek 2DG při současné inhibici rotenonem. Po kombinaci těchto dvou inhibitorů naopak umíralo více buněk v porovnání s inhibicí samotným rotenonem. Proto je paradoxní, že exprese pAMPK α je vyšší v případě, kdy je životaschopnost buněk menší (obrázek 12C). To naznačuje, že při příliš vysokém metabolickém stresu už ani aktivace AMPK nestačí na záchranu buněk, a proto začnou umírat.

Provedené experimenty prokazují, že v buňce při metabolickém stresu vyvolaném inhibicí glykolýzy a oxidativní fosforylace dochází ke zvýšení poměru AMP:ATP, a v důsledku toho se aktivuje AMPK.



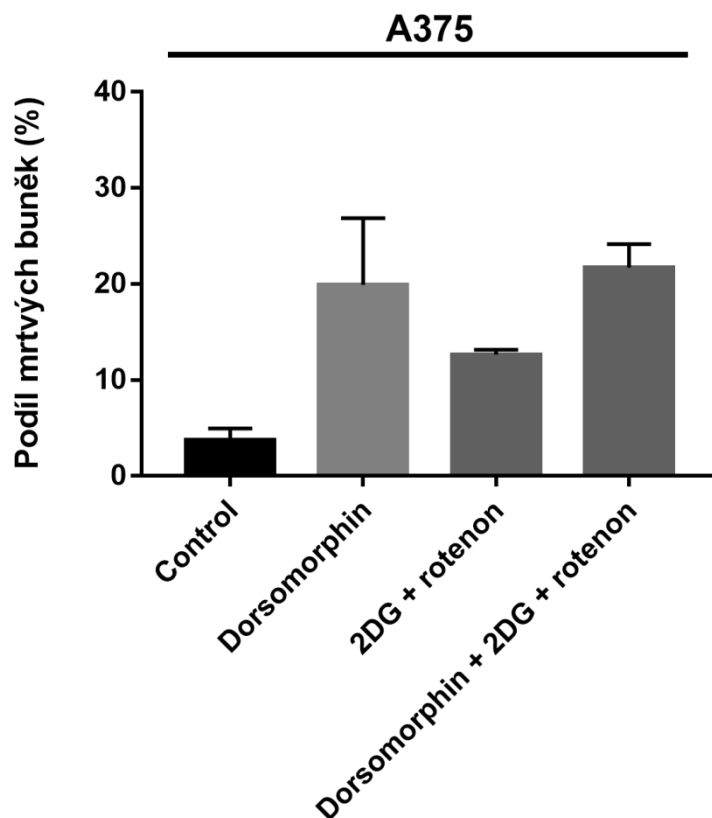
Obrázek 12: Množství proteinů pAMPK α a PCNA po působení inhibitorů oxidativní fosforylace a glykolýzy na buněčné melanomové linie A375 a MelJuso a lidské fibroblasty předkožky (hFF). Detekci jsem provedla pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) ve spojení s western blottingem. Buňky tří linií (MelJuso, A375 a hFF) jsem inkubovala s testovanými látkami po dobu 16 h. Zkoumala jsem vliv inhibitoru hexokinázy 2DG (5 mM), inhibitorů oxidativní fosforylace metformin (5 mM) a rotenon (5 μ M) a jejich vzájemných kombinací na melanomových buňkách linií A375 a MelJuso a lidských fibroblastech předkožky hFF. Jako negativní kontrolu jsem použila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek. Pro ověření, že v jednotlivých vzorcích je skutečně stejné množství proteinu, jsem detekovala protein PCNA. CTR=kontrola; 2DG=2-deoxyglukóza, Met=metformin, Rot=rotenon (zdroj: autor)

6.5 Inhibice AMPK

Abychom potvrdili, že aktivace AMPK chrání buňky A375 před současnou inhibicí oxidativní fosforylace a glykolýzy, rozhodli jsme se pozorovat reakci na inhibici této kinázy. Jako inhibitor AMPK byla zvolena látka dorsomorphin (compound C) v koncentraci 10 μM .

Buňky linie A375 jsem kultivovala po dobu 48 h v přítomnosti kombinace inhibitorů 2DG (5 mM), rotenonu (5 μM) a dorsomorphin (10 μM). Jako negativní kontrolu jsem zvolila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek (5 mM). Poté jsem stanovila životaschopnost buněk pomocí metody průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI.

Ukázalo se, že inhibice AMPK v kombinaci s inhibicí oxidativní fosforylace a glykolýzy neměla zásadní vliv na životaschopnost buněk v porovnání se samotnou inhibicí AMPK (Obrázek 13). V porovnání se samotnou inhibicí AMPK nebyl pozorován zásadní nárůst mrtvých buněk v porovnání s kombinovanou inhibicí. Nelze tak s jistotou tvrdit, že buňky A375 přežívají při současné inhibici 2DG a rotenonem pouze díky aktivaci AMPK.



Obrázek 13: Vliv inhibice AMPK na buňky linie A375 při současné inhibici oxidativní fosforylace a glykolýzy. Buňky jsem kultivovala po dobu 48 h v přítomnosti kombinace inhibitorů 2DG (5 mM), rotenonu (5 μM) a dorsomorphinu (10 μM). Jako negativní kontrolu jsem zvolila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek. Poté jsem stanovila životaschopnost buněk pomocí metody průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI. Graf znázorňuje průměrné hodnoty procentuálního podílu mrtvých buněk ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku (zdroj: autor).

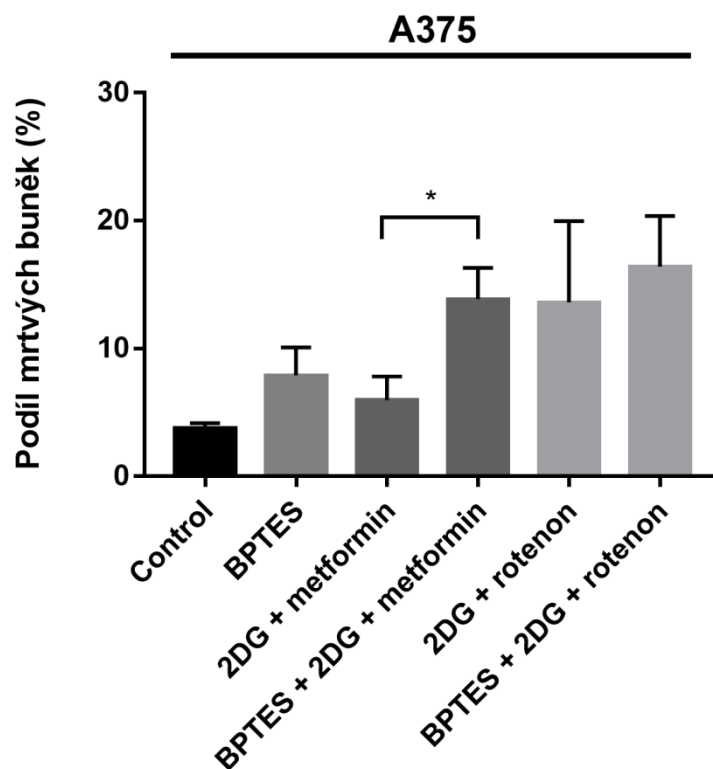
V další sérii experimentů nás zajímalo, jak se nádorové buňky vyrovnávají s dalším zvýšením úrovně metabolického stresu. Rozhodli jsme se zjistit, jak buňky linie A375 reagují na zamezení přístupu glutaminu a poté na inhibici dráhy PI3K.

6.6 Inhibice glutaminolýzy

Jak už bylo zmíněno, glutamin je spolu s glukózou hlavním zdrojem uhlíku pro buněčný růst. Bylo prokázáno, že glutamin udržuje činnost Krebsova cyklu a životaschopnost buněk, pokud je inhibován transport pyruvátu do mitochondrií (Janssens&Goris, 2001; Clem *et al.*, 2008). Předchozí experimenty naší laboratoře naznačují, že je pro buňky s mutací *BRAF*^{V600E} při sníženém glykolytickém toku způsobeném 2DG výhodnější zastavit metabolismus glukózy, a proto se přepínají do stavu, kdy zvyšují příjem glutaminu jako alternativního uhlíkového zdroje. Abychom určili, zda metabolismus glutaminu může přispívat k udržení životaschopnosti buněk A375 po aplikaci 2DG, metforminu a rotenonu, inhibovala jsem využití glutaminu pomocí inhibitoru BPTES.

Buňky linie A375 jsem kultivovala po dobu 48 h v přítomnosti kombinace inhibitorů 2DG (5 mM), rotenon (5 μM) a BPTES (10 μM) a kombinace 2DG (5 mM), metformin (5 mM) a BPTES (10 μM). Jako negativní kontrolu jsem zvolila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek (5 mM). Poté jsem stanovila životaschopnost buněk pomocí metody průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI.

Analýza životaschopnosti buněk ukázala, že inhibitor glutaminázy zvrátil ochranný účinek vyvolaný 2DG (obrázek 14). To naznačuje, že buňky A375, které čelí metabolickým poruchám, by mohly spoléhat na glutamin, aby si zachovaly svou životaschopnost. Přidání BPTES zvýšilo cytotoxicitu u kombinace 2DG a metforminu a vyrovnalo cytotoxicitu na původní hladinu kombinace 2DG a rotenonu. To naznačuje, že právě spotřeba glutaminu by mohla být esenciální pro ochranný efekt 2DG (při ovlivnění 2DG a rotenonem).



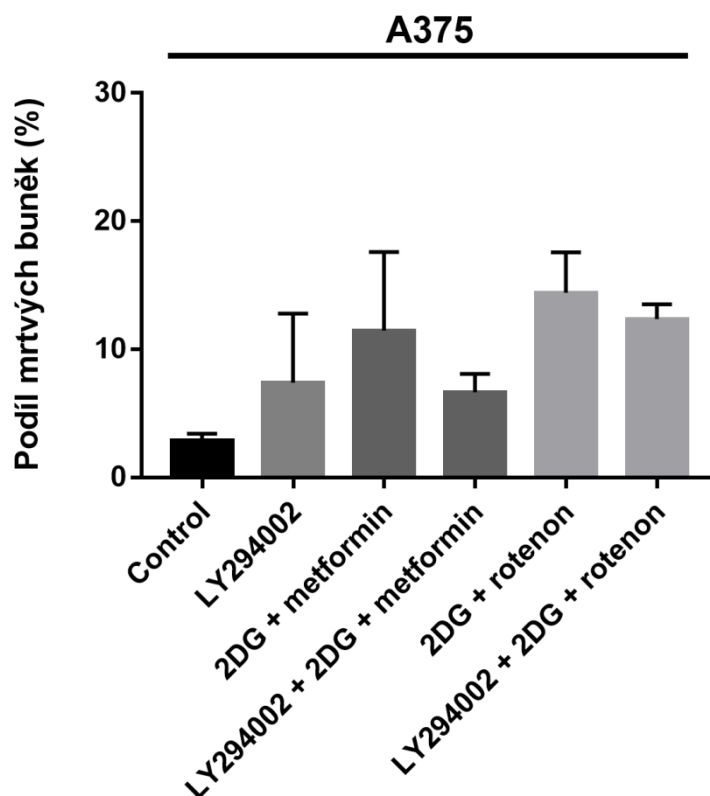
Obrázek 14: Snížený glykolytický tok a dostupnost substrátů pro Krebsův cyklus přispívají k účinku 2DG na přežití buněk A375. Buňky linie A375 jsem kultivovala po dobu 48 h v přítomnosti kombinace inhibitorů 2DG (5 mM), rotenonu (5 μ M) a BPTES (10 μ M) a kombinace 2DG (5 mM), metforminu (5 mM) a BPTES (10 μ M). Jako negativní kontrolu jsem zvolila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek. Poté jsem stanovila životaschopnost buněk pomocí metody průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI. Graf znázorňuje průměrné hodnoty procentuálního podílu mrtvých buněk ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (zdroj: autor).

6.7 Inhibice PI3K

Jedním z dalších přístupů, který by narušil oba zdroje ATP v buňkách, je použití metforminu se současnými klinickými inhibitory fosfatidilinositol-3-kinázy (PI3K), které snižují transport glukózy do buňky a negativně ovlivňují glykolýzu. PI3K/Akt je jednou z nejvýznamnějších signálních drah, která se podílí na buněčném růstu, dělení buněk, inhibici apoptózy, regulaci metabolismu glukózy či proteosyntéze. V dalším experimentu jsem proto zjišťovala chování buněk linie A375 při současné inhibici této signální dráhy a oxidativní fosforylace spolu s glykolýzou.

Jako inhibitor oxidativní fosforylace jsem opět použila inhibitory mitochondriálního komplexu I (rotenon a metformin) a inhibitor hexokinázy (2DG) sloužil na inhibici glykolýzy. Pro inhibici PI3K byla zvolena látka LY294002, která narušuje vazbu ATP do aktivního místa této kinázy.

Ukázalo se, že kináza Akt aktivovaná zvýšenou koncentrací PI3K není pro buňky A375 zásadní pro přežití extrémního metabolického stresu při inhibici dvou nejvýznamnějších zdrojů ATP, oxidativní fosforylace a glykolýzy (obrázek 15).



Obrázek 15: Životaschopnost buněk A375 při inhibici PI3K, oxidativní fosforylace a glykolýzy. Buňky linie A375 jsem kultivovala po dobu 48 h v přítomnosti kombinace inhibitorů 2DG (5 mM), rotenonu (5 μ M) a LY294002 (25 μ M) a kombinace 2DG (5 mM), metforminu (5 mM) a LY294002 (25 μ M). Jako negativní kontrolu jsem zvolila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek. Poté jsem stanovila životaschopnost buněk pomocí metody průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI. Graf znázorňuje průměrné hodnoty procentuálního podílu mrtvých buněk ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku (zdroj: autor).

6.8 Inhibice PIKfyve a mitochondriálního komplexu I

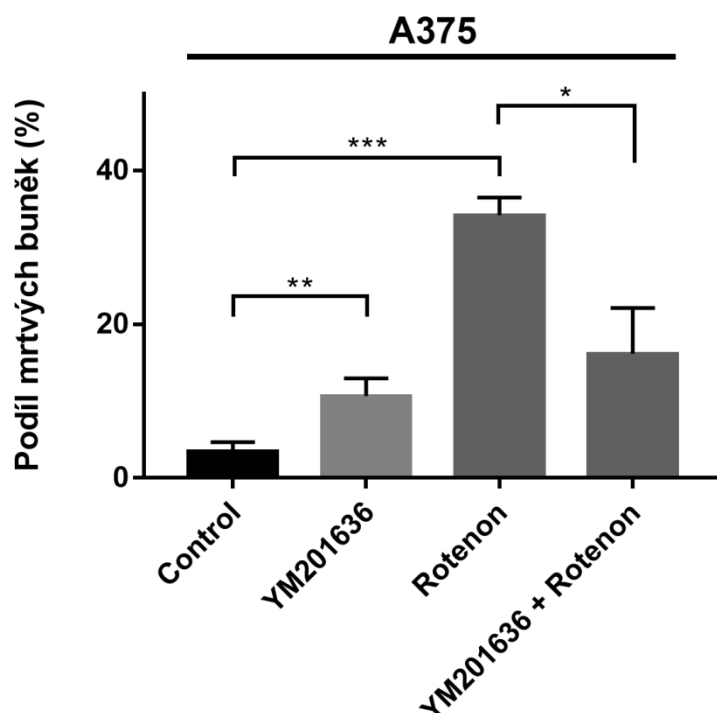
V další části mé práce jsem zkoumala chování buněk linie A375 při inhibici PIKfyve a mitochondriálním stresu. Kináza PIKfyve v buňkách reguluje mimo jiné příjem živin endocytózou.

6.8.1 Inhibice PIKfyve chrání buňky A375 ošetřené inhibitorem mitochondriálního komplexu I před smrtí

Jako první jsem zjišťovala životaschopnost buněk A375 při metabolickém stresu navozeném inhibicí mitochondriálního komplexu I a PIKfyve. Jako inhibitor této kinázy byl zvolen YM201636 o koncentraci 2 μM a mitochondriální stres zajišťoval již dříve používaný rotenon o koncentraci 5 μM .

Buňky linie A375 jsem kultivovala po dobu 48 h v přítomnosti inhibitorů YM201636 (2 μM), rotenon (5 μM) a jejich vzájemné kombinaci. Jako negativní kontrolu jsem zvolila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek. Poté jsem stanovila životaschopnost buněk pomocí metody průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI.

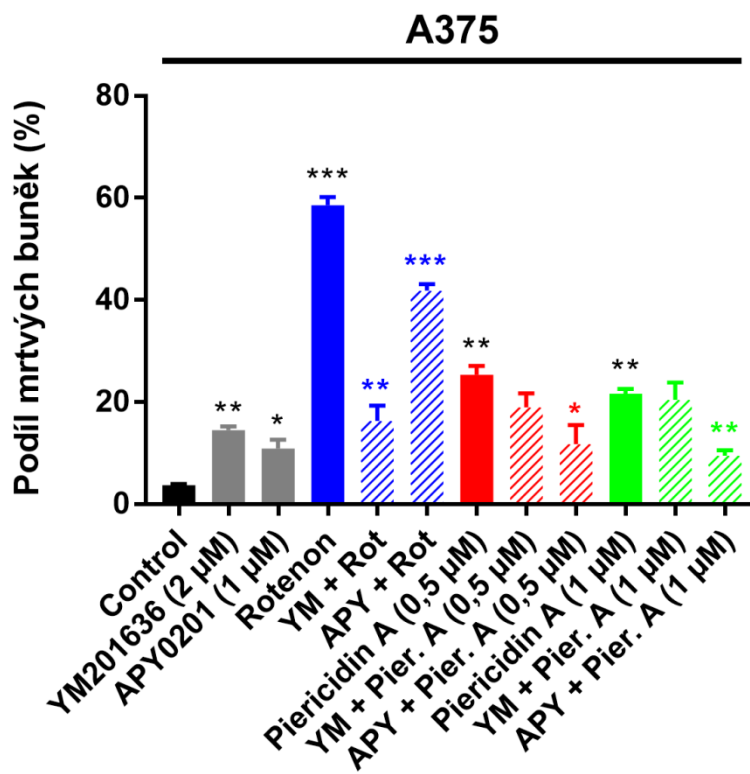
Dalo by se předpokládat, že buňky poškozené inhibicí mitochondriálního komplexu I a s nefunkční endocytózou budou mít výrazně nižší životaschopnost. Je proto překvapivé, že procento živých buněk A375 bylo vyšší při současné inhibici PIKfyve a mitochondriálního komplexu I oproti samotné inhibici mitochondriálního komplexu I. Podíl mrtvých buněk se zde lišil o téměř 20 procent (obrázek 16).



Obrázek 16: Buňky A375 ošetřené inhibitorem mitochondriálního komplexu I chrání před smrtí inhibice PIKfyve. Buňky linie A375 jsem kultivovala po dobu 48 h v přítomnosti inhibitorů YM201636 (2 μM), rotenonu (5 μM) a jejich vzájemné kombinaci. Jako negativní kontrolu jsem zvolila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek. Poté jsem stanovila životaschopnost buněk pomocí metody průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI. Graf znázorňuje průměrné hodnoty procentuálního podílu mrtvých buněk ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$, symbol *** na hladině významnosti $P < 0,005$ (zdroj: autor).

Pro ověření, že buňky linie A375 ošetřené inhibitorem mitochondriálního komplexu I chrání před smrtí skutečně inhibice PIKfyve, jsem zopakovala stejný pokus s jinými inhibitory PIKfyve a mitochondriálního komplexu I. Inhibici této kinázy zajistila látka APY0201 o koncentraci 1 μM a inhibici mitochondriálního komplexu I látka piericidin A o koncentracích 0,5 μM a 1 μM .

I tentokrát se ukázalo, že při kombinaci inhibitorů APY0201 a piericidinu A nebo rotenonu umíralo znatelně méně buněk (Obrázek 17) v porovnání se samotným rotenonem nebo APY0201. Tímto experimentem se potvrdilo, že zvýšená životaschopnost buněk A375 při inhibici mitochondriálního komplexu I je způsobena inhibicí PIKfyve.

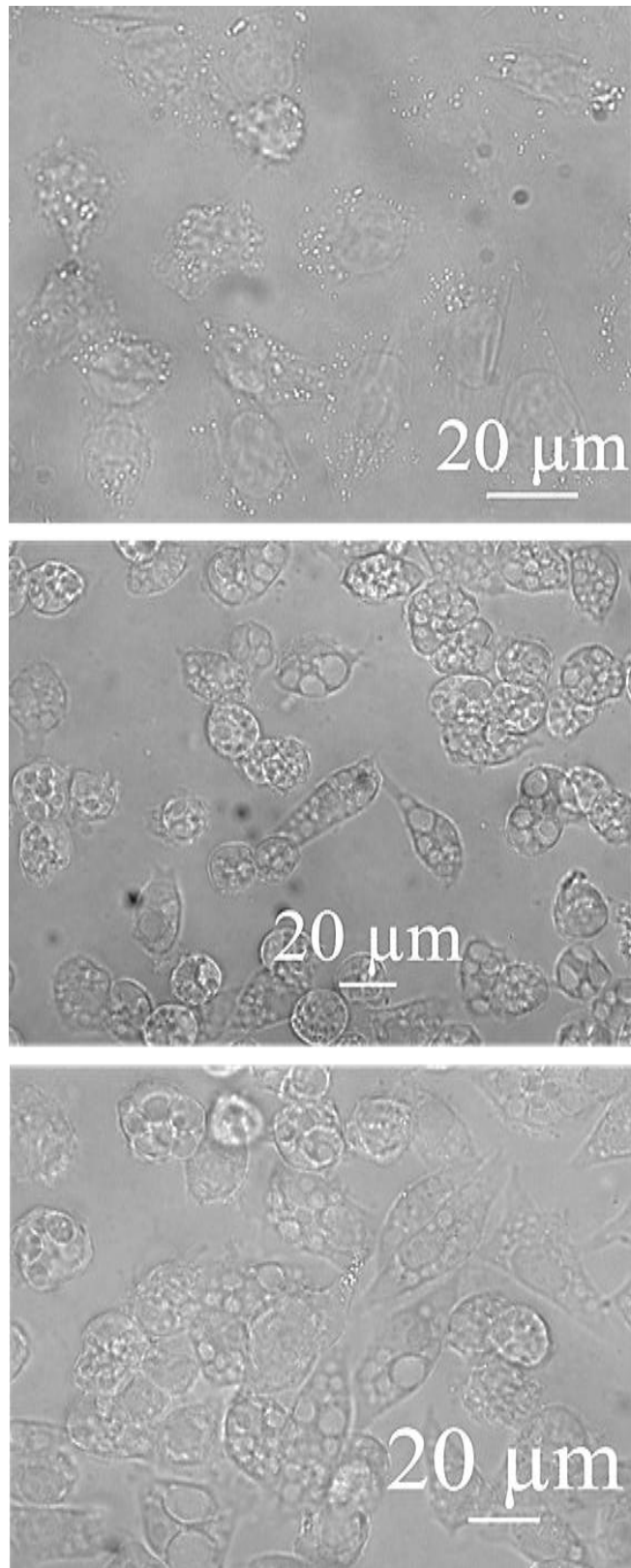


Obrázek 17: Inhibice PIKfyve chrání před smrtí buňky A375 ošetřené inhibitorem mitochondriálního komplexu I. Buňky linie A375 jsem kultivovala po dobu 48 h v přítomnosti inhibitorů YM201636 (2 μM), piericidinu A (0,5 μM a 1 μM), APY0201 (1 μM), rotenonu (5 μM) a jejich vzájemné kombinaci. Jako negativní kontrolu jsem zvolila DMSO v množství odpovídajícímu koncentraci testovaných látek. Poté jsem stanovila životaschopnost buněk pomocí metody průtokové cytometrie a fluorescenčního barviva PI. Graf znázorňuje průměrné hodnoty procentuálního podílu mrtvých buněk ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$, symbol *** na hladině významnosti $P < 0,005$. **Modře** oproti rotenonu, **červeně** oproti piericidinu A (0,5 μM), **zeleně** oproti piericidinu A (1 μM), **černě** oproti kontrole (zdroj: autor).

6.8.2 PIKfyve narušuje endocytózu

Kináza PIKfyve je zodpovědná za správný příjem živin endocytózou. Abychom ověřili, že inhibice PIKfyve narušuje tento proces, pozorovala jsem na vakuolizaci buněk A375 konfokálním mikroskopem.

Jak můžeme vidět na obrázku 18, oba inhibitory PIKfyve indukují v buňkách linie A375 tvorbu vakuol. Tímto experimentem se tedy potvrdilo, že použité inhibitory PIKfyve narušují buněčné linii A375 vezikulární transport a pravděpodobně tedy i endocytózu.



Obrázek 17: Vakuolizace buněk A375 v důsledku narušení endocytózy inhibicí PIKfyve. Buňky linie A375 byly kultivovány po dobu 24 h v přítomnosti inhibitorů APY0201 o koncentraci 0,5 μM a YM201636 o koncentraci 2 μM . Shora: kontrola, APY0201 (0,5 μM), YM201636 (2 μM). Snímky byly pořízeny na mikroskopu LSM 700 Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss Microscopy) (zdroj: autor).

6.8.3 Inhibice PIKfyve vede ke snížení produkce kyslíkových radikálů

Jelikož se nám podařilo prokázat, že snížení aktivity PIKfyve v buňkách A375 zvyšuje jejich schopnost přežít za stresových podmínek navozených inhibicí mitochondriálního komplexu I, dalším krokem bylo zjistit mechanismus ochrany.

Během indukce buněčného stresu může dojít k rozdílné regulaci řady metabolických procesů. Konkrétně rotenon a piericidin A jsou inhibitory komplexu I, které blokují přenos elektronů z Fe-S klastrů na skupinu koenzymů Q, čímž mohou způsobit apoptózu buňky. Na apoptóze se podílí více faktorů, jedním z nich je zvýšená tvorba reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Bylo zjištěno, že cytotoxický efekt rotenonu a piericidinu A úzce souvisí s nárůstem hladiny ROS (Fato *et al.*, 2009). Zajímalo nás proto, jak produkci ROS v mitochondriích ovlivní inhibice kinázy PIKfyve.

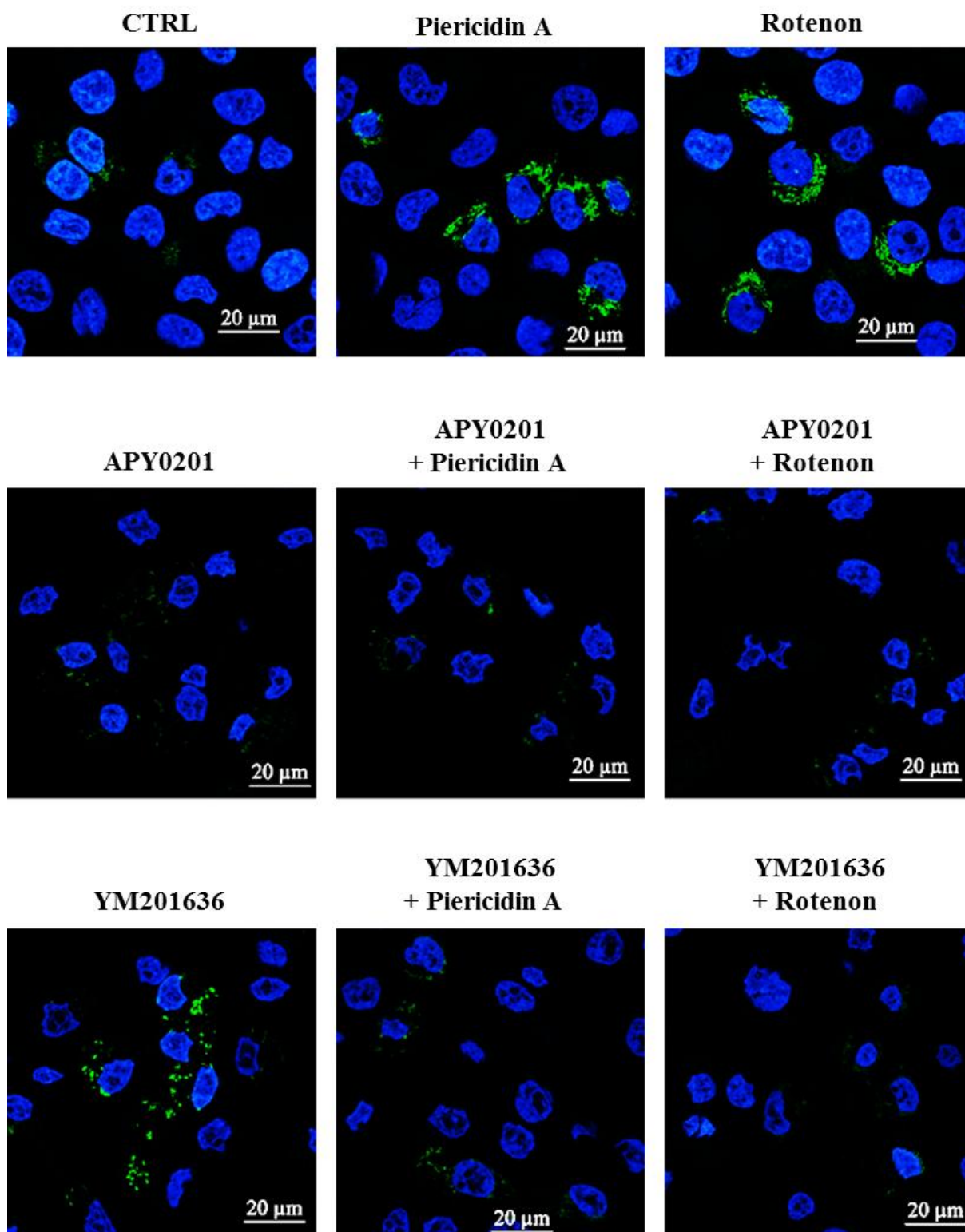
Pro detekci množství ROS v buňce byl využit vektor pHyPer-dMito, který obsahuje fluorescenční senzor HyPer. Senzor HyPer je odvozen od regulační domény proteinu OxyR, který v organismu *Escherichia coli* funguje jako senzor molekul peroxidu vodíku a aktivuje expresi genů indukovaných peroxidem vodíku. Tento senzor s vysokou citlivostí detekuje molekuly peroxidu vodíku v buněčném prostředí, a protože k N-konci senzoru je fúzovaná duplikovaná mitochondriální signální sekvence, je produkt exprese lokalizován výhradně do mitochondrií. Vytvořením buněčné linie stabilně exprimující vektor pHyPer-dMito byl tak vytvořen systém, pomocí kterého byla efektivně kvantifikována produkce reaktivních kyslíkových radikálů v mitochondriích.

Za účelem vytvoření tohoto systému byla buněčná linie U2OS transfekována plazmidovým vektorem pHyPer-dMito obsahujícím gen pro bakteriální rezistenci vůči antibiotiku kanamycin/neomycin. V čase 24 hodin po transfekci byly buňky inkubovány v médiu obsahujícím antibiotikum G418 a transfekovaná buněčná populace byla vystavena působení tohoto antibiotika po dobu 14 dní. Takto byly vyselektovány klony buněčné populace aktivně exprimující transfekovaný plazmid, které byly po odstranění selekčního tlaku antibiotika kultivovány do konfluencí.

Produkci ROS jsme testovali za podmínek ovlivnění metabolickými stresory. Buňky byly inkubovány v přítomnosti inhibitorů rotenon (1 μ M), piericidinu A (1 μ M), YM201636 (2 μ M), APY0201 (1 μ M) a jejich vzájemných kombinací. Po inkubaci s metabolickými stresory byly vzorky zafixovány paraformaldehydem dle protokolu pro imunofluorescenci. Buněčná jádra byla pozorována pomocí interkalačního barviva DAPI a signál fluorescenčního senzoru HyPer byl detekován díky značce GFP vložené do sekvence regulační domény proteinu OxyR v senzoru.

Na obrázku 19 je vyobrazen překryv signálu s detekcí buněčných jader pomocí interkalačního barviva DAPI (modrý signál) a zeleného signálu vektoru pHyPer-dMito detekujícího molekuly peroxidu vodíku. Potvrdilo se zvýšení hladiny ROS po ovlivnění buněk inhibitory komplexu I, rotenonem a piericidinem A. Taktéž při inhibici PIKfyve inhibitory YM201636 a APY0201 byla zaznamenána mírně zvýšená intenzita signálu fluorescenčního senzoru HyPer detekujícího reaktivní molekuly peroxidu vodíku produkované v mitochondriích. Je však překvapivé, že při vzájemné inhibici kinázy PIKfyve a blokaci aktivity komplexu I nebyl signál senzoru na rozdíl od kontrolních vzorků detekován (obrázek 19).

Tímto se ukázalo, že inhibice PIKfyve zřejmě chrání buňky ovlivněné inhibitorem komplexu I před smrtí snížením produkce reaktivních kyslíkových radikálů. Deregulace endocytózy by tak mohla ovlivnit některý z metabolických procesů v mitochondriích a v důsledku snížení produkce ROS snížit míru buněčného stresu indukovaného inhibicí komplexu I.



Obrázek 19: Inhibice PIKfyve vede ke snížení produkce kyslíkových radikálů (zdroj: autor).

7 Diskuze

Nádorové buňky mají velmi odlišný metabolismus oproti normálním buňkám, od kterých jsou odvozeny. Jsou více závislé na aerobní glykolýze, syntéze mastných kyselin a glutaminolýze. Rozdíl v jejich metabolismu podporuje buněčnou proliferaci a snižuje apoptózu indukovanou léčivou, což může vést k rezistenci na terapii. Přeprogramovaný metabolismus, jakožto jeden z charakteristických znaků nádorových buněk, se v poslední době stává atraktivním cílem protinádorové terapie

V této práci byla sledována odpověď nádorových buněk maligního melanomu s mutací *BRAF* a *NRAS* na extrémní metabolický stres, jemuž jsou rychle proliferující buňky často vystaveny. Ten byl navozen nedostatkem živin a blokadou klíčových metabolických drah pomocí nízkomolekulárních inhibitorů.

Velké množství studií prokázalo, že nádorové buňky různých typů se dokážou metabolicky adaptovat na podmínky, kdy nemají potřebný přísun živin (Yun *et al.*, 2009; Hernandez-Davies *et al.*, 2015). Dochází v nich k mutaci signálních drah (jako je např. RAS-RAF-MAPK a PI3K-AKT) podporujících glykolýzu, což však vede k nadměrné spotřebě glukózy. Pro nádorové buňky je též charakteristická neadekvátní vaskularizace, proto nejsou rovnoměrně zásobovány kyslíkem a živinami a musí se adaptovat na hypoxii a glukózovou deprivaci (Romero-Garcia *et al.*, 2011). Scott *et al.* (2011) ve své studii uvedli jako hlavní náhradu za glukózu pro Krebsův cyklus glutamin. Jejich studie také naznačuje, že u melanomu v přítomnosti adekvátní hladiny glukózy za nedostatku kyslíku dochází k oddělení glykolýzy od Krebsova cyklu.

Naše výsledky dokazují, že buňky melanomu s mutacemi *BRAF* (A375) a *NRAS* (MelJuso) se relativně dobře vyrovnávají s extrémním metabolickým stresem, kdy jim je zamezen přístup k jakýmkoli živinám. Metabolismus nádoru je tedy závislý na glukóze a glutaminu, ale i jejich úplné omezení buňky poměrně dlouho přežívají. Je však překvapivé, že obě linie vykazovaly vyšší životaschopnost při zamezení jakýchkoli živin oproti přežití za přidavku glukózy.

To naznačuje, že u buněk A375 a MelJuso muselo dojít k vyvinutí dalších obranných mechanismů, které jim pomáhají přežít při potlačení energetického metabolismu, což je v souladu s efektem, který byl popsán ve studii Crabtree (1941). Ta dokazuje metabolickou adaptaci buněk na nízkou hladinu glukózy, popřípadě na nedostatek glukózy (Jin *et al.*, 2007), kdy znovu využívají mitochondrie k tvorbě energie.

Vzhledem k pozměněnému metabolismu jsou nádorové buňky citlivé vedle nedostatku glukózy i na inhibici mitochondriálních funkcí (Pelicano *et al.*, 2003; El Mjiyad *et al.*, 2011b).

Cílená regulace metabolismu glukózy vnějším vlivem může probíhat na více úrovních. Mezi nejčastější přístupy patří cílení na glukózové transportéry, hexokinázu (HK), pyruvát kinázu M2, glutaminázu a isocitrát dehydrogenázu (Akins *et al.*, 2018). HK je izoenzym fosforylující glukózu na glukózu-6-fosfát (G-6-P). Vznik G-6-P je první reakcí v dráze glykolýzy a také startovním bodem pentózofosfátového cyklu. Hexokináza II (HKII) je izoenzym HK, který rozhoduje o celkovém výkonu glykolýzy, a jeho unikátní vlastností je vazba na vnější mitochondriální membránu (Bustamante&Pedersen, 1977; Rempel *et al.*, 1996; Ko *et al.*, 2001). Podle některých studií mohou být nádorové buňky na HKII závislé a její inhibice by tak mohla být úspěšnou terapeutickou strategií (Patra *et al.*, 2013). V našich experimentech jsme buňky stresovali analogem glukózy 2-deoxy-D-glukózou (2DG). Tato látka je fosforylována HK za vzniku 2-deoxyglukózy-6-fosfátu, analogu G-6-P, který kompetitivně inhibuje tvorbu G-6-P z glukózy, čímž zastavuje celý proces glykolýzy a zabraňuje buňce v produkci ATP přeměnou glukózy na pyruvát. Kromě snížené produkce ATP může 2DG i zablokovat buněčný cyklus, snížit a inhibovat buněčný růst a dokonce způsobit buněčnou smrt

(Giammarioli *et al.*, 2012b; Golding *et al.*, 2013; Patra *et al.*, 2013). Množství 2DG přijaté buňkou je přitom přímo úměrné množství glukózových transportérů na membráně. V současné době prochází 2DG klinickým testováním ve fázi I/II pro léčbu několika typů rakoviny. Výsledky měření životaschopnosti buněk melanomu s mutacemi *NRAS* a *BRAF* však ukazují, že buňky obou linií vykazovaly relativně vysokou odolnost vůči tomuto inhibitoru glykolýzy. Vzhledem k tomu, že snížená intracelulární produkce ATP vede ke zvýšení poměru AMP/ATP, který aktivuje AMP-aktivovanou kinázu (AMPK) (Kim *et al.*, 2013), rozhodli jsme se detekovat hladinu tohoto proteinu v buňkách ovlivněných 2DG. Jelikož však v tomto systému nebyla detekována zvýšená hladina AMPK, tato kináza zřejmě výrazně nepřispívá k cytoprotektivnímu účinku 2DG. To poukazuje také na skutečnost, že samotná energetická deprivace není postačující na protinádorový účinek 2DG. Za prvé je ATP potřebný jak pro vnitřní, tak pro vnější cestu apoptózy (Kim *et al.*, 2013) a za druhé potlačení glykolýzy nevede automaticky k buněčné smrti, neboť některé buňky udržují funkce oxidativní fosforylace a využívají jiné uhlíkové zdroje (například aminokyseliny) k syntéze ATP za podmínek normoxie. Pro metabolické přeprogramování nádorových buněk je charakteristická pozměněná funkce mitochondrií. Otto Warburg (1956) původně předpokládal, že je jejich aktivita potlačena, pozdější studie však tuto hypotézu vyvrátily. Naopak mitochondrie v nádorových buňkách sehrávají důležitou úlohu v udržování mitochondriálního potenciálu a redoxní rovnováhy potřebné pro kontrolu apoptózy a anabolických procesů (Raez *et al.*, 2013).

Nejzajímavější látkou, která ovlivňuje řetězec elektronového transportu (dále jen ETC – electron transport chain) a je studována v souvislosti s rakovinou, je lék na diabetes mellitus 2. typu, metformin. Myšlenka na možné uplatnění metforminu v protinádorové terapii vzešla z epidemiologických studií na pacientech s diabetem, u nichž byla pozorována nižší incidence nádorových onemocnění (o 31 %) v porovnání s diabetiky léčenými jiným způsobem (Gandini *et al.*, 2014). Atraktivita metforminu spočívá kromě jeho bezpečnosti také v nádorové specifitě. Inhibuje komplex I ETC, což narušuje proces oxidativní fosforylace. Působením tohoto inhibitoru dochází v buňce k aktivaci AMP-aktivované kinázy (AMPK). Jelikož je hlavní úlohou této kinázy regulace buněčného metabolismu, jedním z možných vysvětlení protinádorového účinku metforminu je útlum metabolismu, kdy dochází k potlačení růstu a navození autofagie. Výsledky měření však neprokázaly cytotoxicitu metforminu vůči buňkám A375 ani MelJuso a k aktivaci AMPK též nedošlo.

Další látkou zasahující mitochondrie, kterou jsme využívali při našich pokusech, je rotenon. Rotenon patří do skupiny inhibitorů zvaných „mitocans“, které mohou způsobit smrt buňky zvýšenou produkcí ROS a destabilizací mitochondrií (Biasutto *et al.*, 2010). Taktéž studie Pathania *et al.* (2009) prokázala protinádorovou aktivitu těchto inhibitorů *in vivo*. Protinádorový účinek rotenonu byl potvrzen i v našich experimentech u buněk A375 a MelJuso.

Skutečnost, že se buňky obou linií dokázaly vyrovnat s narušením metabolismu glukózy či oxidativní fosforylace, nás vedla k dalšímu zkoumání reakce buněk na současnou inhibici těchto procesů. Eventuálně bychom tak mohli zvážit potenciál metabolických stresorů jako terapeutickou strategii pro buňky melanomu nesoucí mutace *NRAS* a *BRAF*.

Jelikož samotná léčba 2DG nebo metforminem významně neindukuje buněčnou smrt u většiny rakovinných buněk, kombinují se tato léčiva s jinými látkami, aby se dosáhlo synergického terapeutického účinku. Problémem většiny současných protinádorových terapií je buď velké množství vedlejších účinků nebo postupný rozvoj rezistence, což omezuje jejich klinické použití. K překonání těchto obtíží se kombinuje několik druhů terapií. Látka 2DG se například využívá při kombinované léčbě s ozařováním (Giammarioli *et al.*, 2012a).

Analog glukózy 2DG se jeví jako potenciálně zajímavý zejména v kombinaci s dalšími léčivy, neboť při sníženém množství glukózy přechází buňka do energeticky úsporného režimu. Byly publikovány

studie, podle kterých by navození tohoto klidového stavu ve zdravých buňkách mohlo přispět k jejich ochraně před cytotoxickými účinky jiných léčiv. Naopak nádorové buňky by mohly být citlivější vůči těmto léčivům, neboť by nedokázaly v odpovědi na nedostatek glukózy zpomalit metabolismus a zastavit proliferaci (El Mjiyad *et al.*, 2011b). To se však nepotvrdilo u buněk melanomu A375 a MelJuso, které byly ovlivněny metforminem a 2DG. Po ovlivnění oběma inhibitory jsme nezaznamenali výrazný pokles životaschopnosti buněk ani jedné linie, což by mohla vysvětlovat aktivace AMPK, kterou jsme pozorovali u současného působení metforminem a 2DG. Toto zjištění je v rozporu se studii, které zkoumaly působení simultánní inhibice glykolýzy pomocí 2DG a inhibice oxidativní fosforylace buď chemickou (nízkomolekulární inhibitory), genetickou nebo environmentální (hypoxie) cestou. Liu *et al.* (2001) prokázali, že 2DG v kombinaci s mitochondriálními blokátory ETC, jako je antimycin A nebo rotenon, učinila buňky osteosarkomu náchylnější k umírání. Saha *et al.* (2010) dále zjistili, že kombinace 2DG a metforminu byla pro buňky rakoviny prostaty více toxická než každá z těchto látek samostatně, což mohlo být způsobeno tím, že metformin inhiboval autofagii indukovanou 2DG. Je tedy nutno říci, že buňky melanomu nesoucí mutace *NRAS* a *BRAF* jsou na rozdíl od buněk jiných nádorů odolnější vůči stresu indukovanému 2DG a metforminem, a tudíž pro ně není kombinace těchto dvou inhibitorů vhodnou terapeutickou strategií.

Jako překvapivý se ukázal výsledek dvojitého zasažení bioenergetického metabolismu inhibitorem glykolýzy 2DG a inhibitorem mitochondriálního komplexu I rotenonem. Dle výsledků předchozích studií (Liu *et al.*, 2001; Fath *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2012; Palorini *et al.*, 2013) by se dalo předpokládat, že i u melanomu s mutacemi *NRAS* a *BRAF* se projeví synergický účinek těchto dvou inhibitorů. Je však zajímavé, že životaschopnost buněk obou linií byla výrazně vyšší při vzájemné kombinaci 2DG a rotenonu. Tento ochranný účinek 2DG jsme se rozhodli zkoumat dál. Jelikož působením obou inhibitorů dochází k zastavení glykolýzy a oxidativní fosforylace, a tudíž ke zvýšení poměru ATP/AMP, detekovali jsme v buňkách i zvýšenou aktivitu kinázy AMPK (pAMPK). U buněk A375 byla skutečně pozorována vyšší hladina aktivované kinázy při vzájemné kombinaci 2DG a rotenonu oproti samotnému rotenonu. U MelJuso nebyl signál již tak výrazný, je však nutno podotknout, že i množství kontrolního proteinu PCNA bylo v případě buněk ovlivněných kombinací 2DG a rotenonu nižší. Aktivaci AMPK jako možný ochranný mechanismus 2DG při inhibici rotenonem naznačoval též experiment, při němž jsme inhibovali AMPK látkou dorsomorphinem. Jelikož však nebyl rozdíl mrtvých buněk při kombinované inhibici (2DG, rotenon, dorsomorphin) a samotné inhibici AMPK signifikantní, nelze s jistotou tvrdit, že se na ochranném efektu 2DG podílí pouze aktivace AMPK.

Naproti tomu by role kinázy AMPK u normálních buněk byla zřejmě rozdílná, než tomu bylo u buněk nádorových. Kináza AMPK se u lidských předkožkových fibroblastů (hFF) výrazně aktivovala po ovlivnění metforminem a 2DG s rotenonem. Předchozí výsledky však ukázaly, že metabolický stres indukovaný 2DG a rotenonem způsobil větší mortalitu hFF než nádorových buněk. To potvrzuje přeprogramování metabolismu v nádorových buňkách.

Dále se nám podařilo prokázat, že buňky melanomu s mutací *BRAF*^{V600E} umírají více při současné inhibici glykolýzy, oxidativní fosforylace i glutaminolýzy. To naznačuje, že by přežití buněk A375, u nichž je zablokována glykolýza i oxidativní fosforylace, mohlo více záviset na příjmu glutaminu. Tím se potvrdily předchozí výsledky naší laboratoře (Verlande *et al.*, 2018), které naznačovaly, že je pro buňky s mutací *BRAF*^{V600E} při sníženém glykolytickém toku způsobeném 2DG výhodnější zastavit metabolismus glukózy, a proto se přepínají do stavu, kdy zvyšují příjem glutaminu jako alternativního uhlíkového zdroje. Již zmiňovaná studie Scotta *et al.* (2011) uvedla glutamin jako náhradu za glukózu pro Krebsův cyklus.

Vzhledem k možnému využití metabolismu glutaminu při inhibici glykolýzy i oxidativní fosforylace jsme dospěli k závěru, že metabolické cílení pomocí inhibitoru glykolýzy, jako je 2DG, nemusí být vhodnou terapeutickou strategií pro melanomy nesoucí mutaci *BRAF*^{V600E}. Mimoto je poněkud složité přesně definovat podmínky, za jakých nastane metabolický stres ve fyziologickém prostředí. Nádorové mikroprostředí je prostorově a časově heterogenní, obsahuje oblasti s nízkým obsahem kyslíku a nízkým pH a oblasti s vysokou hladinou kyslíku a normálním pH. Dostupnost kyslíku a živin závisí na blízkosti buněk k cévám a určuje jejich bazální metabolický stav. Příjem 2DG tedy bude záviset na počátečním metabolickém stavu rakovinné buňky. 2DG tak může metabolicky stresovat vysoce glykolytické rakovinné buňky snadněji než rakovinné buňky, které se více spoléhají na oxidativní fosforylaci.

V metabolismu nádoru sehrává klíčovou roli také řada signálních drah. Jednou z nich je signální dráha kináz PI3K/AKT, která podporuje buněčné přežití, stimuluje buněčnou proliferaci, glukózový metabolismus a aktivně potlačuje apoptózu (Blume-Jensen&Hunter, 2001; Manning&Cantley, 2007). Bylo dokázáno, že zvýšená signalizace dráhy AKT přímo odpovídá zvýšené rychlosti glukózového metabolismu v nádorových buňkách (Baenke *et al.*, 2016). Tato aktivita kinázy AKT ji činí vhodným a slibným cílem pro terapii melanomu. V naší studii jsme testovali inhibitor LY294002. Jedná se o nejčastěji popisovaný inhibitor dráhy AKT, který například u neuroblastomu významně redukuje aktivitu AKT, snižuje životaschopnost buněk a indukuje zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Sartelet *et al.*, 2010). Jiná studie ukázala, že inhibice AKT tlumí spotřebu glukózy a indukuje parametry značící oxidativní stres (Simons *et al.*, 2012).

V našich studiích jsme nezaznamenali vysokou toxicitu při působení samotného inhibitoru LY294002 na buněčnou linii A375, čímž jsme nemohli potvrdit výsledky dříve publikovaných studií inhibitoru dráhy PI3K/AKT na buňky melanomu. Při působení kombinace inhibitorů oxidativní fosforylace, glykolýzy a látky LY294002 dokonce došlo k mírnému poklesu množství mrtvých buněk, což ještě více podtrhuje schopnost buněk melanomu s mutací *BRAF*^{V600E} adaptovat se na metabolický stres.

V druhé části naší práce byl zkoumán vliv inhibitoru kinázy PIKfyve na buňky s mutací *BRAF*^{V600E}. Fosfatidylinositol-3-fosfát 5-kináza (PIKfyve) je lipidová kináza, která fosforyluje fosfatidylinositol-3-fosfát (PI3P) za vzniku fosfatidylinositol 3,5-bisfosfátu [PtdIns(3,5)P2] nebo fosfatidylinositol 5-fosfátu (PtdIns5P) (Shisheva, 2001; Sbrissa *et al.*, 2004). PtdIns(3,5)P2 a PtdIns5P se zapojují do několika buněčných funkcí, včetně vezikulárního transportu, aktivace iontových kanálů a signalizace receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) (Kim *et al.*, 2007; Takasuga&Sasaki, 2013; McCartney *et al.*, 2014b).

Studie také naznačují, že PIKfyve se podílí na onkogenezi a migraci rakovinných buněk (Ikonomov *et al.*, 2013b; Oppelt *et al.*, 2014b) a snížení hladiny proteinu PIKfyve vede k významnému snížení migrace rakovinných buněk (Oppelt *et al.*, 2013). Nedávné výsledky navíc prokázaly, že inhibice aktivity PIKfyve pomocí inhibitoru YM201636 vedla k výraznému snížení buněčné proliferace u více typů rakoviny (Dupuis-Coronas *et al.*, 2011b; Oppelt *et al.*, 2014b).

Nejprve byla proto analyzována životaschopnost buněk A375 po ovlivnění inhibitorem YM201636. Na rozdíl od jiných typů rakoviny se u buněk melanomu neprokázal cytotoxický efekt této látky. Naopak se ukázal zajímavý protektivní účinek YM201636 při navození mitochondriálního stresu rotenonem. Tento nečekaný efekt inhibice PIKfyve se potvrdil i v dalším experimentu. Abychom ověřili, že buňky ošetřené inhibitorem mitochondriálního komplexu I přežívají více skutečně díky inhibici PIKfyve, použili jsme také jiný inhibitor PIKfyve APY0201 a jiný inhibitor mitochondriálního komplexu I piericidin A. Z výsledků měření životaschopnosti buněk A375 je skutečně patrný snížený podíl mrtvých buněk po simultánním ovlivnění inhibitorem PIKfyve

(YM201636 nebo APY0201) a inhibítorom mitochondriálního komplexu I v porovnání se samotným působením inhibítora mitochondriálního komplexu I.

Mnohé studie naznačují, že protinádorové látky cílící na mitochondrie či indukující nestabilitu mitochondrií obvykle působí následkem zvýšení reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Za hlavní zdroje ROS jsou považovány mitochondriální komplex I a komplex III (Turrens *et al.*, 1985). Jelikož jsou mitochondrie důležitými místy produkce ROS, dalo by se předpokládat, že narušení homeostázy v této organelle by mohlo indukovat řadu změn v buněčném metabolismu a poškodit buněčné struktury, proteiny či DNA. Konkrétně u rotenonu byla v mnohých studiích prokázána zvýšená tvorba ROS vedoucí k následné apoptóze (Pelicano *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2005; Fato *et al.*, 2009). To nás vedlo ke zvažování, že by inhibice PIKfyve mohla chránit buňky ovlivněné inhibítorom oxidativní fosforylace právě snížením hladiny ROS. Tato domněnka se také potvrdila v experimentu detekujícím v buňkách množství ROS, konkrétně produkci peroxidu vodíku. Výsledky ukázaly, že mitochondrie v buňkách s inhibovanou funkcí PIKfyve i oxidativní fosforylace produkují výrazně méně ROS (konkrétně H_2O_2) v porovnání s kontrolními vzorky. Lze tedy předpokládat, že buňky melanomu s mutací *BRAF*^{V600E} aktivují při inhibici PIKfyve mechanismy, které vedou ke snížení produkce škodlivých ROS a chrání je před mitochondriálním stresem.

8 Závěr

Pochopení přeprogramování metabolických procesů v nádorových buňkách je nezbytné pro vývoj nových terapií nádorových onemocnění cílících na změněný buněčný metabolismus. V naší práci jsme se zaměřili na odolnost buněk maligního melanomu s mutacemi *NRAS* nebo *BRAF* vůči extrémnímu metabolickému stresu s cílem blíže charakterizovat jednotlivé mechanismy umožňující přežití a tím přispět k objasnění rezistence buněk melanomu.

Naše dosažené výsledky ukazují, že buňky A375 i MelJuso se dokážou vyrovnat s extrémním metabolickým stresem indukovaným absencí jakýchkoli živin. Buňky obou linií přežívaly při současné inhibici oxidativní fosforylace a glykolýzy, hlavních metabolických drah zajišťujících tvorbu ATP. Jejich životaschopnost byla vyšší při dvojitěm zasažení energetického metabolismu oproti samotné inhibici oxidativní fosforylace, což bylo zřejmě způsobeno více faktory. V buňkách došlo k aktivaci AMPK a navíc jsme ukázali, že metabolický stres stimuluje zvýšení spotřeby glutaminu, aby se zachovala životaschopnost buněk s mutací *BRAF*^{V600E}. Proto se zdá, že cílení metabolickými stresory jako je 2DG nemusí být účinnou strategií protinádorové terapie maligního melanomu.

Dále byl analyzován vliv inhibice lipidové kinázy PIKfyve na buňky A375 ovlivněné inhibitorem mitochondriálního komplexu I. Paradoxně byl zjištěn ochranný účinek inhibice této kinázy při mitochondriálním stresu. Příčinou bylo snížení tvorby reaktivních kyslíkových radikálů. K pochopení působení inhibitorů PIKfyve na buňky melanomu by přispěla podrobná analýza mechanismu buněčné smrti. Do budoucna by bylo také zajímavé naše měření zopakovat na dalších buněčných liniích, abychom ověřili, že se nejedná o efekt specifický pouze pro daný buněčný typ.

Hlavním přínosem této práce jsou nové podněty pro další výzkum molekulárních mechanismů, jež umožňují nádorovým buňkám přežít za podmínek extrémního metabolismu. Práce také naznačuje některé rozdíly mezi odpovědí na metabolický stres u nádorových a normálních buněk a současně přispívá k pochopení účinků kombinací inhibitorů hlavních drah buněčného energetického metabolismu. Použití vhodně zvolených metabolických inhibitorů by v budoucnu mohlo poskytnout požadovanou vysokou selektivitu a toxicitu v heterogenním mikroprostředí nádoru.

Použitá literatura a zdroje

Aft, R. L., Zhang, F. W. a Gius, D. (2002) „Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: Mechanism of cell death", *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 87(7), s. 805–812. doi: 10.1038/sj.bjc.6600547.

Ahmad, I. M. *et al.* (2005) „Mitochondrial O₂.- and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced cytotoxicity and oxidative stress in human cancer cells", *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M411662200.

Airley, R. *et al.* (2001) „Glucose transporter Glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix", *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 7(4), s. 928–934.

Akins, N. S., Nielson, T. C. a Le, H. V. (2018) „Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer", *Current Topics in Medicinal Chemistry*. Bentham Science Publishers Ltd., 18(6), s. 494–504. doi: 10.2174/1568026618666180523111351.

Baenke, F. *et al.* (2016) „Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells", *Molecular Oncology*. Elsevier B.V., 10(1), s. 73–84. doi: 10.1016/j.molonc.2015.08.003.

Koždoňová, K. (2019) „Kináza AMPK jako kritický regulátor buněčné energetické homeostázy". Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Ústav experimentální biologie, vedoucí práce Mgr. Stjepan Uldrijan, CSc.

Biasutto, L. *et al.* (2010) „Mitochondrially targeted anti-cancer agents", *Mitochondrion*. doi: 10.1016/j.mito.2010.06.004.

Blume-Jensen, P. a Hunter, T. (2001) „Oncogenic kinase signalling", *Nature*. Nature, s. 355–365. doi: 10.1038/35077225.

Bustamante, E. a Pedersen, P. L. (1977) „High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.74.9.3735.

Cairns, R. A., Harris, I. S. a Mak, T. W. (2011) „Regulation of cancer cell metabolism", *Nature Reviews Cancer*. doi: 10.1038/nrc2981.

Carnero, A. *et al.* (2008) „The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications", *Current Cancer Drug Targets*. Bentham Science Publishers Ltd., 8(3), s. 187–198. doi: 10.2174/156800908784293659.

Cheng, G. *et al.* (2012) „Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death", *Cancer Research*. NIH Public Access, 72(10), s. 2634–2644. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3928.

Choi, Y. K. a Park, K. G. (2018) „Targeting glutamine metabolism for cancer treatment", *Biomolecules and Therapeutics*. Korean Society of Applied Pharmacology, s. 19–28. doi: 10.4062/biomolther.2017.178.

Clem, B. *et al.* (2008) „Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth", *Molecular Cancer Therapeutics*. Mol Cancer Ther, 7(1), s. 110–120. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0482.

Crabtree, H. G. (1941) „Stimulation of Tumor Induction by an Inhibitor of Cell Glycolysis", *Cancer Research*.

- Davis, E. J. *et al.* (2018) „Melanoma: What do all the mutations mean?“, *Cancer*. John Wiley and Sons Inc., s. 3490–3499. doi: 10.1002/cncr.31345.
- Deberardinis, R. J. a Cheng, T. (2010) „Q’s next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer“, *Oncogene*. *Oncogene*, s. 313–324. doi: 10.1038/onc.2009.358.
- Druker, B. J. *et al.* (2006) „Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia“, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society , 355(23), s. 2408–2417. doi: 10.1056/NEJMoa062867.
- Dupuis-Coronas, S. *et al.* (2011a) „The nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase oncogene interacts, activates, and uses the kinase PIKfyve to increase invasiveness“, *Journal of Biological Chemistry*. *J Biol Chem*, 286(37), s. 32105–32114. doi: 10.1074/jbc.M111.227512.
- Dupuis-Coronas, S. *et al.* (2011b) „The nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase oncogene interacts, activates, and uses the kinase PIKfyve to increase invasiveness“, *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M111.227512.
- Elstrom, R. L. *et al.* (2004) „Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells“, *Cancer Research*. *Cancer Res*, 64(11), s. 3892–3899. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2904.
- Fath, M. A. *et al.* (2009) „Mitochondrial electron transport chain blockers enhance 2-deoxy-D-glucose induced oxidative stress and cell killing in human colon carcinoma cells“, *Cancer Biology and Therapy*. *Landes Bioscience*, 8(13), s. 1228–1236. doi: 10.4161/cbt.8.13.8631.
- Fato, R. *et al.* (2009) „Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species“, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.11.003.
- Gandini, S. *et al.* (2014) „Metformin and cancer risk and mortality: A systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders“, *Cancer Prevention Research*. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0424.
- Ganguly, S. S. *et al.* (2012) „c-Abl and Arg are activated in human primary melanomas, promote melanoma cell invasion via distinct pathways, and drive metastatic progression“, *Oncogene*, 31(14), s. 1804–1816. doi: 10.1038/onc.2011.361.
- Gatenby, R. A. a Gillies, R. J. (2004) „Why do cancers have high aerobic glycolysis?“, *Nature Reviews Cancer*. *Nat Rev Cancer*, s. 891–899. doi: 10.1038/nrc1478.
- Giammarioli, A. M. *et al.* (2012a) „Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy- D -glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response“, *International Journal of Cancer*. *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.26420.
- Giammarioli, A. M. *et al.* (2012b) „Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response“, *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 131(4), s. E337–E347. doi: 10.1002/ijc.26420.
- Golding, J. P. *et al.* (2013) „Targeting tumour energy metabolism potentiates the cytotoxicity of 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy“, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 109(4), s. 976–982. doi: 10.1038/bjc.2013.391.
- Hanahan, D. a Weinberg, R. A. (2011) „Hallmarks of cancer: The next generation“, *Cell*. Elsevier, s. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Haq, R. *et al.* (2013) „Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF“, *Cancer Cell*. doi: 10.1016/j.ccr.2013.02.003.

- Hardie, D. G. (2011) „Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase", in *American Journal of Clinical Nutrition*. Am J Clin Nutr. doi: 10.3945/ajcn.110.001925.
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. a Thompson, C. B. (2009a) „Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation", *Science*. American Association for the Advancement of Science, s. 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. a Thompson, C. B. (2009b) „Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation", *Science*, s. 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.
- Hernandez-Davies, J. E. *et al.* (2015) „Vemurafenib resistance reprograms melanoma cells towards glutamine dependence", *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd., 13(1). doi: 10.1186/s12967-015-0581-2.
- Hessvik, N. P. *et al.* (2016) „PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy", *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG, 73(24), s. 4717–4737. doi: 10.1007/s00018-016-2309-8.
- Holmes, D. (2014) „The cancer that rises with the sun", *Nature*. Nature Publishing Group, 515(7527), s. S110–S111. doi: 10.1038/515S110a.
- Ikonomov, O. C. *et al.* (2013a) „The PIKfyve-ArPIKfyve-Sac3 triad in human breast cancer: Functional link between elevated Sac3 phosphatase and enhanced proliferation of triple negative cell lines", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Biochem Biophys Res Commun, 440(2), s. 342–347. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.080.
- Ikonomov, O. C. *et al.* (2013b) „The PIKfyve-ArPIKfyve-Sac3 triad in human breast cancer: Functional link between elevated Sac3 phosphatase and enhanced proliferation of triple negative cell lines", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.080.
- Ikonomov, O. C., Sbrissa, D. a Shisheva, A. (2001) „Mammalian Cell Morphology and Endocytic Membrane Homeostasis Require Enzymatically Active Phosphoinositide 5-Kinase PIKfyve", *Journal of Biological Chemistry*. J Biol Chem, 276(28), s. 26141–26147. doi: 10.1074/jbc.M101722200.
- Jang, M., Kim, S. S. a Lee, J. (2013) „Cancer cell metabolism: Implications for therapeutic targets", *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group, s. e45–e45. doi: 10.1038/emm.2013.85.
- Janssens, V. a Goris, J. (2001) „Protein phosphatase 2A: A highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling", *Biochemical Journal*. Biochem J, s. 417–439. doi: 10.1042/0264-6021:3530417.
- Jin, S. *et al.* (2007) „Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death", *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.03349.
- Jin, S. a White, E. (2007) „Role of autophagy in cancer: Management of metabolic stress", *Autophagy*. Taylor and Francis Inc., s. 28–31. doi: 10.4161/auto.3269.
- Kaplan, O. *et al.* (1990) „Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism.", *Cancer research*. Cancer Res, 50(3), s. 544–51. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2297696> (Viděno: 16. únor 2020).
- Kim, J. *et al.* (2007) „The phosphoinositide kinase PIKfyve mediates epidermal growth factor receptor trafficking to the nucleus", *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1333.
- Kim, S. M. *et al.* (2013) „Glycolysis inhibition sensitizes non-small cell lung cancer with T790M mutation to irreversible EGFR inhibitors via translational suppression of Mcl-1 by AMPK activation",

Molecular Cancer Therapeutics. Mol Cancer Ther, 12(10), s. 2145–2156. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1188.

Ko, Y. H., Pedersen, P. L. a Geschwind, J. F. (2001) „Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: Characterization and targeting hexokinase“, *Cancer Letters*. doi: 10.1016/S0304-3835(01)00667-X.

Krejčíř R, Valík D a Vojtěšek B (2018) „Využití mitochondriálních procesů v cílené terapii nádorových onemocnění Mitochondrial Processes in Targeted Cancer Therapy“, *Klin Onkol*, 31(2), s. 2–14. doi: 10.14735/amko20182S14.

Li, J. *et al.* (1997) „PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer“, *Science*. doi: 10.1126/science.275.5308.1943.

Liu, H. *et al.* (2001) „Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors“, *Biochemistry*. *Biochemistry*, 40(18), s. 5542–5547. doi: 10.1021/bi002426w.

Livingstone, E. *et al.* (2015) „Combining BRAFV600E inhibition with modulators of the mitochondrial bioenergy metabolism to overcome drug resistance in metastatic melanoma“, *Experimental Dermatology*. doi: 10.1111/exd.12718.

Maehama, T. a Dixon, J. E. (1998) „The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate“, *Journal of Biological Chemistry*. *J Biol Chem*, 273(22), s. 13375–13378. doi: 10.1074/jbc.273.22.13375.

Manning, B. D. a Cantley, L. C. (2007) „AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream“, *Cell*. *Cell*, s. 1261–1274. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.

Masopust, J. a Průša, R. (2003) „Patobiochemie buňky“, *Klinická Biochemie a Metabolismus*.

Mates, J. M. *et al.* (2013) „Glutaminase Isoenzymes as Key Regulators in Metabolic and Oxidative Stress Against Cancer“, *Current Molecular Medicine*. Bentham Science Publishers Ltd., 13(4), s. 514–534. doi: 10.2174/1566524011313040005.

McCartney, A. J. *et al.* (2014a) „Activity-dependent PI(3,5)P₂ synthesis controls AMPA receptor trafficking during synaptic depression“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(45), s. E4896–E4905. doi: 10.1073/pnas.1411117111.

McCubrey, J. A. *et al.* (2007) „Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance“, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. NIH Public Access, s. 1263–1284. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.

Miniotis, M. F. *et al.* (2013) „MEK1/2 inhibition decreases lactate in BRAF-driven human cancer cells“, *Cancer Research*. *Cancer Res*, 73(13), s. 4039–4049. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1969.

Mitochondrie, nový cíl protirakovinné terapie - Časopis Vesmír (nedatováno). Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2017/cislo-11/mitochondrie-novy-cil-protirakovinne-terapie.html> (Viděno: 16. únor 2020).

El Mjiyad, N. *et al.* (2011a) „Sugar-free approaches to cancer cell killing“, *Oncogene*. *Oncogene*, s. 253–264. doi: 10.1038/onc.2010.466.

Mohanti, B. K. *et al.* (1996) „Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: Phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas“, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. Elsevier Inc., 35(1), s. 103–111. doi: 10.1016/S0360-3016(96)85017-6.

Moley, K. H. a Mueckler, M. M. (2000) „Glucose transport and apoptosis“, *Apoptosis*. doi:

10.1023/A:1009697908332.

Moreno-Sánchez, R. *et al.* (2007) „Energy metabolism in tumor cells”, *FEBS Journal*. FEBS J, s. 1393–1418. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.

Murray, R. K. a Davis, J. C. (2014) *Harper's Illustrated Biochemistry 30th Edition, Molecular Physiology*. doi: 10.1016/0307-4412(88)90029-5.

Nagarajan, A., Malvi, P. a Wajapeyee, N. (2016) „Oncogene-Directed Alterations in Cancer Cell Metabolism”, *Trends in Cancer*. Cell Press, s. 365–377. doi: 10.1016/j.trecan.2016.06.002.

Nicot, A.-S. *et al.* (2006) „The Phosphoinositide Kinase PIKfyve/Fab1p Regulates Terminal Lysosome Maturation in *Caenorhabditis elegans*”, *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology (ASCB), 17(7), s. 3062–3074. doi: 10.1091/mbc.e05-12-1120.

Niehr, F. *et al.* (2011) „Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations”, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central, 9(1), s. 76. doi: 10.1186/1479-5876-9-76.

Osuský, R. (2015) „Změny v regulaci buněčného metabolismu charakteristické pro nádorové buňky”. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Ústav experimentální biologie, vedoucí práce Mgr. Stjepan Uldrijan, CSc.

Oppelt, A. *et al.* (2013) „Production of phosphatidylinositol 5-phosphate via PIKfyve and MTMR3 regulates cell migration”, *EMBO Reports*. doi: 10.1038/embor.2012.183.

Oppelt, A. *et al.* (2014a) „PIKfyve, MTMR3 and their product PtdIns5P regulate cancer cell migration and invasion through activation of Rac1”, *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd, 461(3), s. 383–390. doi: 10.1042/BJ20140132.

Oppelt, A. *et al.* (2014b) „PIKfyve, MTMR3 and their product PtdIns5P regulate cancer cell migration and invasion through activation of Rac1”, *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/BJ20140132.

Owens, B. (2014) „Melanoma”, *Nature*. Nature Publishing Group, s. S109. doi: 10.1038/515S109a.

Palorini, R. *et al.* (2013) „Mitochondrial complex I inhibitors and forced oxidative phosphorylation synergize in inducing cancer cell death”, *International Journal of Cell Biology*. Hindawi Limited, 2013. doi: 10.1155/2013/243876.

Panieri, E. a Santoro, M. M. (2016) „Ros homeostasis and metabolism: A dangerous liason in cancer cells”, *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/cddis.2016.105.

Pathania, D., Millard, M. a Neamati, N. (2009) „Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism”, *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi: 10.1016/j.addr.2009.05.010.

Patra, K. C. *et al.* (2013) „Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer”, *Cancer Cell*. doi: 10.1016/j.ccr.2013.06.014.

Pelicano, H. *et al.* (2003) „Inhibition of mitochondrial respiration: A novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism”, *Journal of Biological Chemistry*. J Biol Chem, 278(39), s. 37832–37839. doi: 10.1074/jbc.M301546200.

Pfeiffer, T., Schuster, S. a Bonhoeffer, S. (2001) „Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways”, *Science*. American Association for the Advancement of Science, 292(5516), s. 504–507. doi: 10.1126/science.1058079.

Raez, L. E. *et al.* (2013) „A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71(2), s. 523–530. doi: 10.1007/s00280-012-2045-1.

Rempel, A. *et al.* (1996) „Glucose catabolism in cancer cells: Amplification of the gene encoding type II hexokinase", *Cancer Research*.

Romero-Garcia, S. *et al.* (2011) „Tumor cell metabolism: An integral view", *Cancer Biology and Therapy*. Taylor & Francis, s. 939–948. doi: 10.4161/cbt.12.11.18140.

Sahra, I. Ben *et al.* (2010) „Targeting cancer cell metabolism: The combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells", *Cancer Research*. *Cancer Res*, 70(6), s. 2465–2475. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2782.

Sano, O. *et al.* (2016) „Vacuolin-1 inhibits autophagy by impairing lysosomal maturation via PIKfyve inhibition", *FEBS Letters*. Wiley Blackwell, s. 1576–1585. doi: 10.1002/1873-3468.12195.

Sartelet, H. *et al.* (2010) „High level of apoptosis and low AKT activation in mass screening as opposed to standard neuroblastoma", *Histopathology*. Blackwell Publishing Ltd, 56(5), s. 607–616. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03522.x.

Sbrissa, D. *et al.* (2004) „A Mammalian Ortholog of *Saccharomyces cerevisiae* Vac14 That Associates with and Up-Regulates PIKfyve Phosphoinositide 5-Kinase Activity", *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.24.23.10437-10447.2004.

Scott, D. A. *et al.* (2011) „Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: Beyond the Warburg effect", *Journal of Biological Chemistry*. *J Biol Chem*, 286(49), s. 42626–42634. doi: 10.1074/jbc.M111.282046.

Shaw, R. J. *et al.* (2004) „The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), s. 3329–3335. doi: 10.1073/pnas.0308061100.

Shisheva, A. (2001) „PIKfyve: The road to PtdIns 5-P and PtdIns 3,5-P₂", *Cell Biology International*. Academic Press, s. 1201–1206. doi: 10.1006/cbir.2001.0803.

Simons, A. L. *et al.* (2012) „The role of akt pathway signaling in glucose metabolism and metabolic oxidative stress", in *Oxidative Stress in Cancer Biology and Therapy*. Humana Press Inc., s. 21–46. doi: 10.1007/978-1-61779-397-4_2.

Souralová, T. (2016) „Plasticita signálních drah nádorových buněk jako výsledek dynamických změn nádorového mikroprostředí". Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Ústav experimentální biologie, vedoucí práce Mgr. Jarmila Navrátilová, Ph.D.

SVOD Analýza (nedatováno). Dostupné z: <https://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#> (Viděno: 16. únor 2020).

Szatrowski, T. P. a Nathan, C. F. (1991) „Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells", *Cancer Research*. *Cancer Res*, 51(3), s. 794–798.

Takasuga, S. a Sasaki, T. (2013) „Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate: Metabolism and physiological functions", *Journal of Biochemistry*. *J Biochem*, s. 211–218. doi: 10.1093/jb/mvt064.

Turrens, J. F., Alexandre, A. a Lehninger, A. L. (1985) „Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria", *Archives of Biochemistry and Biophysics*. *Arch Biochem Biophys*, 237(2), s. 408–414. doi: 10.1016/0003-9861(85)90293-0.

- Verlande, A. *et al.* (2018) „Metabolic stress regulates ERK activity by controlling KSR-RAF heterodimerization", *EMBO reports*. EMBO, 19(2), s. 320–336. doi: 10.15252/embr.201744524.
- Vincent, E. E. *et al.* (2015) „Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Regulates Metabolic Adaptation and Enables Glucose-Independent Tumor Growth", *Molecular Cell*. Cell Press, 60(2), s. 195–207. doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.013.
- Vogelstein, B. a Kinzler, K. W. (2004) „Cancer genes and the pathways they control", *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, s. 789–799. doi: 10.1038/nm1087.
- Walsh, A. B. a Bar-Sagi, D. (2001) „Differential Activation of the Rac Pathway by Ha-Ras and K-Ras", *Journal of Biological Chemistry*. J Biol Chem, 276(19), s. 15609–15615. doi: 10.1074/jbc.M010573200.
- Warburg, O. (1956) „On the origin of cancer cells", *Science*. Science, 123(3191), s. 309–314. doi: 10.1126/science.123.3191.309.
- Weinhouse, S. (1976) „The Warburg hypothesis fifty years later", *Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie*. Springer-Verlag, s. 115–126. doi: 10.1007/BF00284370.
- WICK, A. N. *et al.* (1957) „Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose.", *The Journal of biological chemistry*. J Biol Chem, 224(2), s. 963–969.
- Wieman, H. L., Wofford, J. A. a Rathmell, J. C. (2007) „Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking", *Molecular Biology of the Cell*. Mol Biol Cell, 18(4), s. 1437–1446. doi: 10.1091/mbc.E06-07-0593.
- Yang, L., Venneti, S. a Nagrath, D. (2017) „Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism", *Annual Review of Biomedical Engineering*. Annual Reviews, 19(1), s. 163–194. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044546.
- Yun, J. *et al.* (2009) „Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells", *Science*. Science, 325(5947), s. 1555–1559. doi: 10.1126/science.1174229.
- Z topiče manažerem - Časopis Vesmír* (nedatováno). Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2019/cislo-1/z-topice-manazerem.html>.
- Zaugg, K. *et al.* (2011) „Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress", *Genes and Development*. Genes Dev, 25(10), s. 1041–1051. doi: 10.1101/gad.1987211.
- Zhao, Y. *et al.* (2017) „ROS signaling under metabolic stress: Cross-talk between AMPK and AKT pathway", *Molecular Cancer*. doi: 10.1186/s12943-017-0648-1.
- Zheng, B. *et al.* (2009) „Oncogenic B-RAF Negatively Regulates the Tumor Suppressor LKB1 to Promote Melanoma Cell Proliferation", *Molecular Cell*. Mol Cell, 33(2), s. 237–247. doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.026.

Seznam obrázků

Obrázek 1:	Časový vývoj výskytu a mortality maligního melanomu v ČR.	14
Obrázek 2:	Charakteristické znaky nádorových buněk.....	15
Obrázek 3:	Činitelé způsobující metabolický fenotyp nádoru.....	16
Obrázek 4:	Porovnání metabolismu nádorových a normálních buněk..	18
Obrázek 5:	Schematické znázornění rozdílů mezi oxidativní fosforylací, anaerobní glykolýzou a aerobní glykolýzou (Warburgův efekt).	20
Obrázek 6:	Signální dráha RAS/RAF/MEK/ERK.....	22
Obrázek 7	Přehled vybraných strategií pro cílení mitochondriálních procesů v terapii nádorů.....	26
Obrázek 8	Redoxní stav buňky je určen produkcí a eliminací ROS.....	27
Obrázek 9:	Odolnost buněk linie A375 a MelJuso vůči extrémnímu metabolickému stresu	37
Obrázek 10:	BRAF ^{V600E} i NRAS-mutantní buňky se dokážou vyrovnat s metabolickým stresem vyvolaným současnou inhibicí glykolýzy a oxidativní fosforylace.	39
Obrázek 11:	Porovnání ochranného účinku 2DG na lidské fibroblasty předkožky (hFF) ošetřené rotenonem a na buňky melanomu ošetřené rotenonem (A375 a MelJuso)..	40
Obrázek 12:	Množství proteinů pAMPK α a PCNA po působení inhibitorů oxidativní fosforylace a glykolýzy na buněčné melanomové linie A375 a MelJuso a lidské fibroblasty předkožky (hFF).....	42
Obrázek 13:	Vliv inhibice AMPK na buňky linie A375 při současné inhibici oxidativní fosforylace a glykolýzy.....	43
Obrázek 14	Snížený glykolytický tok a dostupnost substrátů pro Krebsův cyklus přispívají k účinku 2DG na přežití buněk A375.....	45
Obrázek 15:	Životaschopnost buněk A375 při inhibici PI3K, oxidativní fosforylace a glykolýzy. ...	46
Obrázek 16:	Buňky A375 ošetřené inhibitorem mitochondriálního komplexu I chrání před smrtí inhibice PIKfyve..	47
Obrázek 18:	Vakuolizace buněk A375 v důsledku narušení endocytózy inhibicí PIKfyve.	50
Obrázek 19:	Inhibice PIKfyve vede ke snížení produkce kyslíkových radikálů.	52

Seznam tabulek

Tabulka 1:	Používané roztoky a jejich složení	29
Tabulka 2:	Seznam primárních protilátek použitých při analýze exprese proteinů.....	30
Tabulka 3:	Seznam použitých chemikálií pro vyvolání buněčného stresu.....	31