

KLINICKÁ ONKOLOGIE

RECAMO2020:
cestou výzkumu rakoviny k aplikované molekulární onkologii II

RECAMO2020:
through Cancer Research towards Applied Molecular Oncology II

Michalová Ľ., Hrstka R. et al



Obsah | Contents

Variabilita buněčné populace solidních nádorů a její význam pro diagnostiku a terapii nádorových onemocnění Variability of Solid Cancer Cell Population and Its Consequences for Cancer Diagnostics and Treatment Brychtová V., Valík D., Vojtěšek B.	2S5
Využití mitochondriálních procesů v cílené terapii nádorových onemocnění Mitochondrial Processes in Targeted Cancer Therapy Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B.	2S14
Ferropatóza jako nový typ buněčné smrti a její role v léčbě rakoviny Ferroptosis as a New Type of Cell Death and its Role in Cancer Treatment Skoupilová H., Michalová E., Hrstka R.	2S21
Možnosti využití p63 v bioptické diagnostice Possible Usage of p63 in Bioptic Diagnostics Galoczová M., Nenutil R., Coates P.J., Vojtěšek B.	2S27
Význam membránových proteinů v léčbě nádorových onemocnění a možnosti jejich dalšího studia Importance of Membrane Proteins in the Treatment of Tumor Diseases and the Possibilities of Their Further Study Dosedělová L., Nekulová M., Zahradníková M., Faktor J., Vojtěšek B., Hernychová L.	2S32
Vliv metylace DNA na vznik nádorových onemocnění The Effect of DNA Methylation on the Development of Cancer Holčáková J.	2S41
Úloha proteinu HSP70 v nádorech a jeho využití jako terapeutický cíl The Role of HSP70 in Cancer and its Exploitation as a Therapeutic Target Martinková V., Trčka F., Vojtěšek B., Müller P.	2S46
Úloha proteinu HSF1 v nádorové transformaci The Role of HSF1 Protein in Malignant Transformation Šimončík O., Pastorek M., Vojtěšek B., Müller P.	2S55
Proteiny HDM2 a HDMX v lidských nádorech HDM2 and HDMX Proteins in Human Cancer Hároníková L., Vojtěšek B.	2S63
Prima-1 a APR-246 v léčbě nádorových onemocnění Prima-1 and APR-246 in Cancer Therapy Zatloukalová P., Galoczová M., Vojtěšek B.	2S71
Acetylsalicylová kyselina a její potenciál v chemoprevenci kolorektálního karcinomu Acetylsalicylic Acid and its Potential for Chemoprevention of Colorectal Carcinoma Podhorec J., Hrstka R., Bílek O., Tuček Š., Navrátil J., Michalová E., Vojtěšek B.	2S77

Expres a funkční charakterizace miR-34c u karcinomu děložního hrdla The Expression and Functional Characterization of miR-34c in Cervical Cancer Sommerová L., Fraňková H., Anton M., Jandáková E., Vojtěšek B., Hrstka R.	2S82
Circulating Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets in Patients with Colorectal Cancer – Exploratory Analysis of Their Biomarker Potential Subpopulace cirkulujících myeloidních supresových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem – explorativní analýza jejich potenciálu jako biomarkeru Fědorová L., Pilátová K., Selingerová I., Bencsiková B., Budinská E., Zwinsová B., Brychtová V., Langrová M., Šefr R., Valík D., Zdražilová-Dubská L.	2S88
Současné metody analýzy mikroRNA Current Methods of microRNA Analysis Bartošík M., Jiráková L.	2S93
Proteogenomická platforma na identifikáciu nádorovo špecifických antigénov Proteogenomic Platform for Identification of Tumor Specific Antigens Faktor J., Hernychová L., Vojtěšek B., Hupp T.	2S102



Variabilita buněčné populace solidních nádorů a její význam pro diagnostiku a terapii nádorových onemocnění

Variability in the Solid Cancer Cell Population and Its Consequences for Cancer Diagnostics and Treatment

Brychtová V., Valík D., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Nádorové onemocnění se vyvíjí na základě vzniklé somatické mutace evolučním procesem podle Darwinovských pravidel. Vývoj nádoru je proces dynamické klonální expanze a následné selekce vedoucí ke vzniku geneticky odlišných subpopulací přizpůsobených odlišným podmínkám nádorového mikroprostředí konkrétního hostitele. Genom jednotlivých nádorových buněk je utvářen různými selekčními tlaky. Evoluční dráha vývoje nádoru má ve většině případů rozvětvený charakter a jednotlivé nádorové subklony se tak vyvíjejí paralelně. Diverzita klonů v rámci jediné nádorové tkáně vede ke vzniku genetické, epigenetické a fenotypové variability, což současně představuje hlavní překážku exaktní diagnostiky a účinné personalizované léčby konkrétního nádorového onemocnění u konkrétního jedince. Pokroky v sekvenčních technikách nám v současnosti umožňují odpovědět na otázky ohledně růstu a progresu heterogenních nádorů a také jejich schopnosti odpovídat na léčbu. Porozumění mechanismu vzniku a sledování změn na úrovni nádorových klonů v průběhu progresu nádorového onemocnění může pomoci zlepšit účinnost protinádorové léčby. **Cíl:** Tento přehledový článek se zabývá nádorovou heterogenitou a ukazuje, jak klonální diverzita ovlivňuje nádorovou heterogenitu na úrovni genetické, epigenetické i proteinové. Dále popisuje, jak fylogenetika, efektivní nástroj systémové biologie, může pomoci při sledování klonální evoluce nádoru v průběhu jeho progresu a tvorbě metastáz. Na závěr také hodnotí, jakým způsobem přispívá nádorová heterogenita k problémům v diagnostice nádorových onemocnění a jejich léčbě.

Klíčová slova

evoluce nádorů – nádorová heterogenita – nádorová fylogenetika – klonální evoluce

Summary

Background: Cancer develops as a result of somatic mutations and evolutionary processes with a Darwinian character. Tumors evolve by dynamic clonal expansion and selection to form genetically diverse cell subpopulations adapted to different tumor microenvironmental conditions. Within cancer cells, the genome is shaped by various selective pressures. Cancer evolution often follows a branched trajectory with divergent subclones evolving simultaneously. Clonal diversity within the same tumor results in genetic, epigenetic and phenotypic variability in tumor mass, which represents a major obstacle for the development of efficient diagnostics and personalized treatment. Advances in sequencing techniques have enabled a better understanding of the growth, progression and response to cancer treatment in heterogeneous cancers. Concurrently, understanding the mechanisms involved and monitoring changes in cancer clones during disease progression may improve the efficiency of cancer therapy. **Aim:** In this review, we summarize available data on intratumor heterogeneity. We show how intratumor heterogeneity, arising from clonal diversity, manifests itself at various levels, including at the genetic, epigenetic, and protein levels. We describe how phylogenetics, a powerful systems biology approach, can help trace clonal evolution during cancer progression and metastasis formation. We also highlight the main problems caused by intratumor heterogeneity, which hinders the development of novel diagnostics and therapies.

Key words

cancer evolution – intratumor heterogeneity – cancer phylogenetics – clonal evolution

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

The work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Veronika Brychtová, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: vebrychtova@mou.cz

Přijato/Accepted: 8. 8. 2018

doi: 10.14735/amko2018255

Úvod

Nádorové onemocnění je tradičně vnímáno jako genetické onemocnění s charakteristickou progresivní kumulací změn v klíčových genech a signálních dráhách kontrolujících proliferaci buněk. Předpokládá se, že nádor vzniká v důsledku neletální změny genomu, přičemž ve většině případů jde o změny spontánní a méně často jsou tyto změny podmíněny zárodečnou mutací. V 70. letech minulého století byla vyslovena teorie evolučního principu nádorové progresy, která popisuje nádorové onemocnění jako evoluční proces řízený postupnou kumulací somatických mutací a následnou selekcí subklonů [1,2]. Znamená to tedy, že od prvotní události, během které dochází k transformaci zdravé buňky v buňku nádorovou, se až ke stadiu diseminovaného onemocnění nádor vyvíjí procesem selekce. Evoluční teorie progresy nádorů je však lehce odlišná od evoluční teorie druhů [3]. Nádorové buňky jsou vystaveny selekčnímu tlaku mikroprostředí, jako je působení imunitního systému, změna pH, nedostatek živin, anatomické bariéry a působení protinádorové terapie. Tyto tlaky průběžně formují evoluční dráhu nádoru a vznikajících subpopulací [4]. Vzhledem k tomu, že evoluci nádoru lze jen velmi těžko studovat u pacienta – člověka, neboť z etických důvodů není možné průběžně odebírat biopsie progredujícího nádoru, většina studií zabývajících se evoluční historií nádorů je retrospektivních, a tak vychází ze „single time-point“ vzorků. Uvedený přístup je však doposud považován za dostačující, neboť vnitřní nádorová heterogenita (intratumoral heterogeneity – ITH) představuje permanentní záznam mutací vzniklých v průběhu progresy nádoru [5]. Model nádorové evoluce využívá pro studium nádorové progresy fylogenetiku – typ analýzy, která zaznamenává změny v genomu nádoru v podobě evolučního stromu.

V populaci pacientů s nádorovým onemocněním je třeba rozlišovat ITH (intratumoral) a mezinádorovou heterogenitu (intertumoral). Mezinádorová heterogenita označuje různorodost nádorů stejného histologického typu mezi různými pacienty a předpokládá se, že vy-

chází z lokalizace tumoru v rámci orgánu a z původu buněk. Je také ovlivněna specifickými vlastnostmi hostitele, jako je věk, hormonální status, zárodečné genetické variace, komorbidita a souběžné medikace a environmentální faktory [6]. ITH charakterizuje různorodost nádorových buněk v nádorové tkáni jediného pacienta. Zahrnuje prostorovou heterogenitu, která vychází z nerovnoměrné distribuce geneticky odlišných buněčných populací v nádoru a současně i změny v čase, neboť změny v genomu nádorových buněk probíhají dynamicky [7].

Vnitřní heterogenita nádorů

Nádor jako makroskopicky heterogenní systém popsali již v 19. století Johannes Muller a Rudolf Virchow, kteří pozorovali výrazný pleomorfismus buněk nádorové tkáně [8,9]. V 70. letech 20. století Heppner a další autoři popsali v rámci jedné nádorové tkáně přítomnost odlišných subpopulací, které se od sebe lišily odpovědí na léčbu a schopností metastazovat [10]. Odlišné histologické obrazy je možné v nádorové tkáni pozorovat poměrně často a odpovídají odlišnému stupni diferenciaci a metaplastickým změnám. Morfologická heterogenita je významnou součástí prognostického skórovacího systému, např. u karcinomu prostaty [11].

Nádorová heterogenita je častý jev objevující se u množství nádorových diagnóz [12,13], avšak otázkou stále zůstává, jakým mechanismem vzniká. ITH je formována množstvím vnějších sil působících na nádorový genom a ovlivňujících strukturu nádorové tkáně. Nádorové mikroprostředí tak vytváří tlak, na základě kterého přežívají buňky nejlépe adaptované na podmínky okolí [7].

V poslední době, kdy k významnému posunu v chápání evoluce nádorů přispěl velký pokrok ve využívání sekvenování druhé generace (next generation sequencing – NGS), se upouští od tradičního paradigmatu progresy nádoru jako jednoho klonu s postupně narůstající agresivitou. Nádorová populace je chápána jako komplexní systém tvořený obvykle mnoha jednotlivými geneticky příbuznými subklony, které se vyvíjejí

paralelně [14,15] (srovnání s modelem lineární evoluce v kapitole Klonální evoluce nádorů).

Heterogenita nádorové populace se může rozvíjet v důsledku změn v genomu v rámci klonu nádorové populace, pod tlakem změn v nádorovém mikroprostředí, nebo na pozadí kombinace uvedených faktorů [16]. Mutace vzniklé v nádorových buňkách lze rozdělit do dvou typů – 1. funkčně důležité „driver“ mutace a 2. neutrální „passenger“ mutace, které je pouze doprovázejí a nemají zásadní vliv na agresivitu nádoru. „Driver“ mutace, také označované jako kmenové mutace, představují změny vyskytující se v raných fázích nádorové transformace a je možné je identifikovat ve všech oblastech nádorové tkáně, zatímco „passenger“ mutace jsou aberace lokalizované pouze do určitých menších regionů nádorové populace [17]. Odlišnosti v nádorovém genomu mohou dát vzniknout nádorům s podobným fenotypem, které se však geneticky nepřekrývají. To je dáno především skutečností, že odchylky v buněčném metabolismu a signalizaci mohou být v buňce navozeny prostřednictvím různých mechanismů. Na druhou stranu i fenotyp geneticky identických buněk může být odlišný, neboť přestože jsou nádory architektonicky komplexní, liší se v míře regionální vaskulatury, infiltrace hostitelskými (nenádorovými) buňkami zánětlivými nebo buňkami imunitního systému, složkami pojivové tkáně a dalšími vlastnostmi. Tyto specifické regionální vlastnosti vedou ke vzniku rozdílných mikroprostředí a tím k rozvoji fenotypové heterogenity [18]. ITH se tedy projevuje nejednotností na mnoha úrovních, vč. genetické, epigenetické a fenotypové.

Genetická heterogenita

Genetická heterogenita označuje strukturní a kvantitativní chromozomální změny. Somatické buňky kumulují v průběhu života mutace, které jim dávají selektivní výhodu, jsou to již zmíněné „driver“ mutace, které zvyšují přežití a proliferaci buněk, dále pak mutace neutrální a nakonec mutace, které jsou pro buňky nevýhodné a vedou k jejich smrti nebo senescenci. Ačkoliv má

většina mutací jen malý vliv na celkový stav buňky, i několik málo „driver“ mutací může udělit buňce evoluční výhodu, která jí umožní prosperovat více než ostatním [19]. Rozsáhlé analýzy dat exomového sekvenování ukázaly, že každý nádor dospělého věku nese přibližně 20–300 jednonukleotidových změn (single nukleotide variant – SNV) nebo krátkých inzercí či delecí [20–26]. Kromě toho nádory nesou i změny v počtu kopií genu (copy number variants – CNV) a translokací [27,28].

Epigenetická heterogenita

O epigenetické heterogenitě mluvíme v případech, že nádorová populace vykazuje variabilitu v profilu metylace DNA, acetylace histonů a změny v konformaci chromatinu. Geny kódující regulátory epigenomu patří k nejčastěji mutovaným genům v nádorech. Jejich výsledkem je snížený obsah 5-metylcytosinu, zvýšená metylace normálně nemetylovaných dinukleotidů cytosin-fosfát-guaninu (cytosin-phosphatidyl-guanin – CpG) v promotorech genů kódujících nádorové supresory, genů odpovědných za reparaci DNA a genů souvisejících s metastazováním [29–34]. I když se obecně předpokládá, že se evoluční historie nádoru odvozená z genetických a epigenetických dat může lišit (methylace DNA je reverzibilní proces a je také mnohem více náchylná k chybám než replikace DNA), studie provedené na nádorech mozku a prostaty ukazují shodné profily aberantní metylace DNA, somatických mutací i změn v počtu kopií genů [35,36].

Fenotypová heterogenita

Fenotypová heterogenita vychází z intergrace genetických i negenetických vlivů. Hlavní faktory ovlivňující nádorový fenotyp je možné rozdělit na vnitřní – genetická, epigenetická variabilita a míra diferenciace nádorových buněk, a vnější, u níž je výrazným hráčem nádorové mikroprostředí (fibroblasty, buňky imunitního systému, novotvořené cévy, extracelulární matrix a hypoxie). Vnější (tj. hostitelské) faktory často formují diverzitu nádorových buněk výrazněji než faktory vnitřní [37]. Například u kolorektálního karcinomu a světlobuněčného



Obr. 1. „Trunk-branch“ model nádorové heterogenity.

Vývoj vnitřní nádorové heterogenity se podobá rostoucímu stromu. Kmen stromu představuje „driver“ mutace 1) přítomné v každém subklonu; větve 2) představují jednotlivé klony; a malé větvičky 3) subklony. Biologické vlastnosti jednotlivých oblastí nádoru (subklonů) jsou dány regionálními mutacemi, které mají za určitých podmínek selektivního tlaku potenciál stát se „driver“ mutacemi.

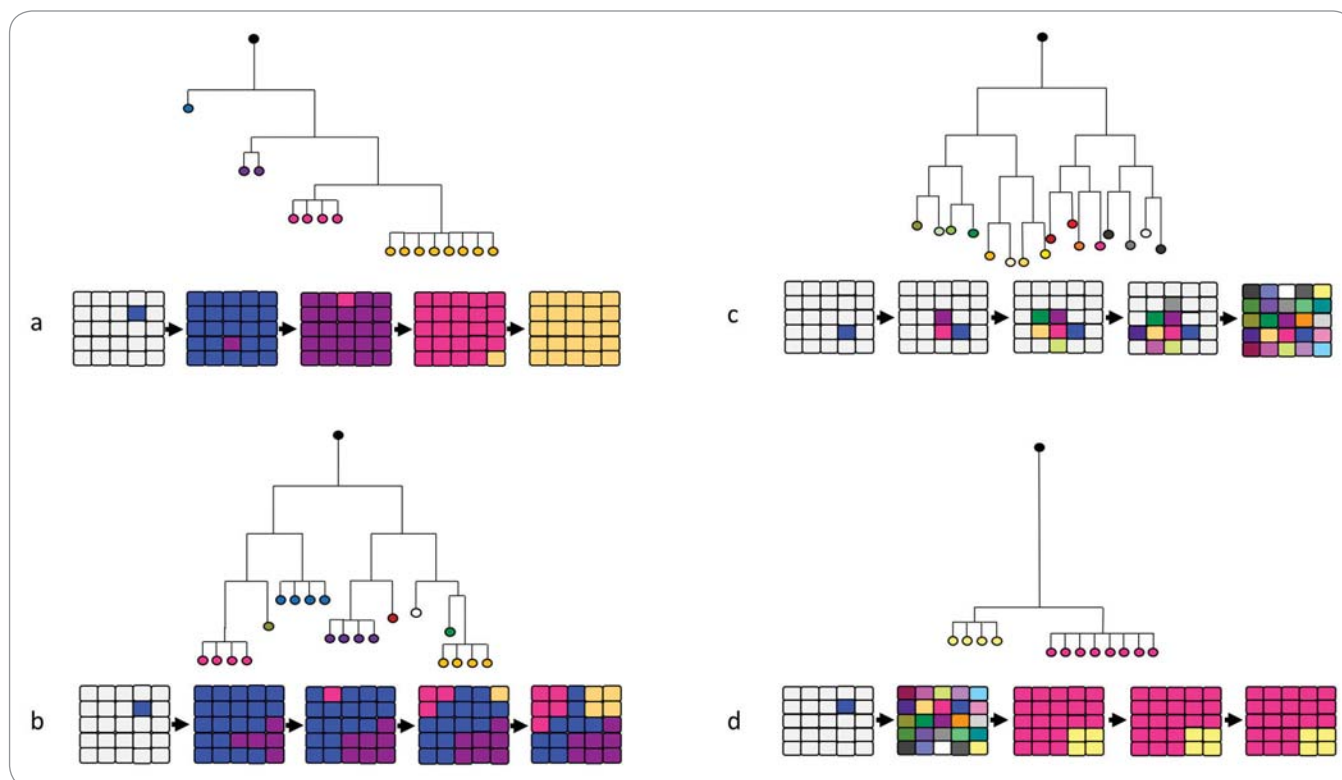
karcinomu vaječníku není heterogenita klonů vždy navázaná na genetickou poruchu, ale často je závislá na podmínkách daného mikroprostředí [38–40].

Klonální evoluce nádorů

Nádorový klon je z definice skupina nádorových buněk, které sdílejí vysoce podobný genotyp a mutační profil, zatímco subklon je skupina buněk, které se oddělily v evoluční linii a získaly další mutace [41] (obr. 1). Populace subklonů nádorových buněk tedy dávají vzniknout heterogennímu prostředí uvnitř nádoru, přičemž jednotlivé subklony nejsou izolované entity. Z hlediska geografického se populace subklonů mohou v rámci nádoru prolínat nebo mohou být naopak prostorově odděleny [42]. Interakce mezi subklony v průběhu nádorové evoluce může být na úrovni kompetice, ale i kooperace. Jeden z klonů může vytlačit ostatní na základě přísunu kyslíku, živin a prostoru, kterých se mu

dostává ve větší míře než ostatním klonům [43]. Některé studie také ukazují, že jednotlivé subklony jsou schopny vzájemně interagovat na základě parakrinní signalizace [44,45].

Selektivní tlak se v průběhu nádorové progresy mění, což přispívá ke změně subklonální architektury a dominance v průběhu vývoje nádoru [42]. Obrovské změny v zastoupení klonů v průběhu času lze pozorovat např. u množství hematologických malignit, jako je chronická lymfocytární, akutní myeloidní nebo akutní lymfoblastická leukemie, u nichž se diagnostické vzorky liší od vzorků získaných v pokročilém stadiu onemocnění [46–49]. Stejně tak u solidních nádorů jsou změny v organizaci nádoru pozorovány na základě srovnání diagnostických vzorků se vzorky rekurencí nebo z porovnání tkáně primárního nádoru s metastázou. Byly popsány čtyři základní mechanismy evoluce nádorů.



Obr. 2. Fylogenetický strom znázorňující mechanismy evoluce nádorů a schematické znázornění progresu vnitřní heterogenity nádoru v průběhu času.

a) lineární model, b) rozvětvený model, c) neutrální model, d) přerušovaný model [71].

Lineární model evoluce nádorů (linear evolution)

Lineární model nádorové progresy je pravděpodobně neznámější a podle něj k mutacím dochází postupně krok za krokem v lineárním sledu. „Driver“ mutace v tomto případě poskytují buňkám tak silnou selektivní výhodu, že předčí všechny předchozí klony a v nádorové tkáni pak převládá jako dominantní klon (obr. 2a). Typickým příkladem lineárního modelu nádorové progresy je Fearon-Vogelsteinova teorie nádorové progresy karcinomu tlustého střeva. Ukazuje, jakým způsobem přispívá po sobě následující zisk „driver“ mutací k posunu onemocnění do pokročilejších stadií s vyšší malignitou [50]. Tento model podporují také histopatologická pozorování nádorové progresy vedoucí od adenomu přes vývoj karcinomu až ke vzniku metastáz u některých nádorových diagnóz.

Rozvětvený model evoluce nádorů (branching evolution)

Model větví se evoluce popisuje klony mající společného předka, při-

čemž se tyto klony vyvíjí paralelně a dávají vzniknout mnoha klonálními liniím. Nedochází zde k vytlačení submisivních klonů, jako je tomu u lineární evoluce, a všechny klony expandují současně (obr. 2b). Pomocí NGS byl typický mutační profil zahrnující kmenové mutace, mutace specifické pro jednotlivé subklony a další mutace v jednotlivých buňkách identifikován u nádorů prsu, prostaty, jater, ledvin, vaječníku, melanomu a u kolorektálního karcinomu [51–63]. Počet klonů a tvar evolučního stromu se mezi diagnózami liší, nicméně u některých diagnóz lze pozorovat společné rysy (dlouhé větve evolučního stromu u některých typů nádorů prsu) [55,57,64]. Rozvětvená evoluce nádorů byla popsána u mnoha nádorů, vč. progresy adenomu na karcinom u nádorového onemocnění tlustého střeva, karcinomu slinivky břišní a prsu [51,65–67].

Model neutrální evoluce nádorů (neutral evolution)

Hypotéza neutrální evoluce vychází z představy, že nedochází k selektivní vý-

hodě v průběhu vývoje nádoru a jedná se spíše o kumulaci náhodných mutací vedoucí ke genetickému driftu a výrazné heterogenitě (obr. 2c). Ta je pak vedlejším efektem bez funkčního významu pro nádorový růst. Jedná se však o extrémní teorii, která má poměrně málo důkazů v klinické praxi [68].

Model přerušované evoluce nádorů (punctuated evolution)

U některých nádorů se na začátku progresy kumulují velké množství genetických aberací způsobujících extenzivní heterogenitu nádorové tkáně s velkým počtem subklonů. Postupně pak dochází k jejich redukci díky expanzi jednoho nebo několika dominantních klonů [69,70] (obr. 2d).

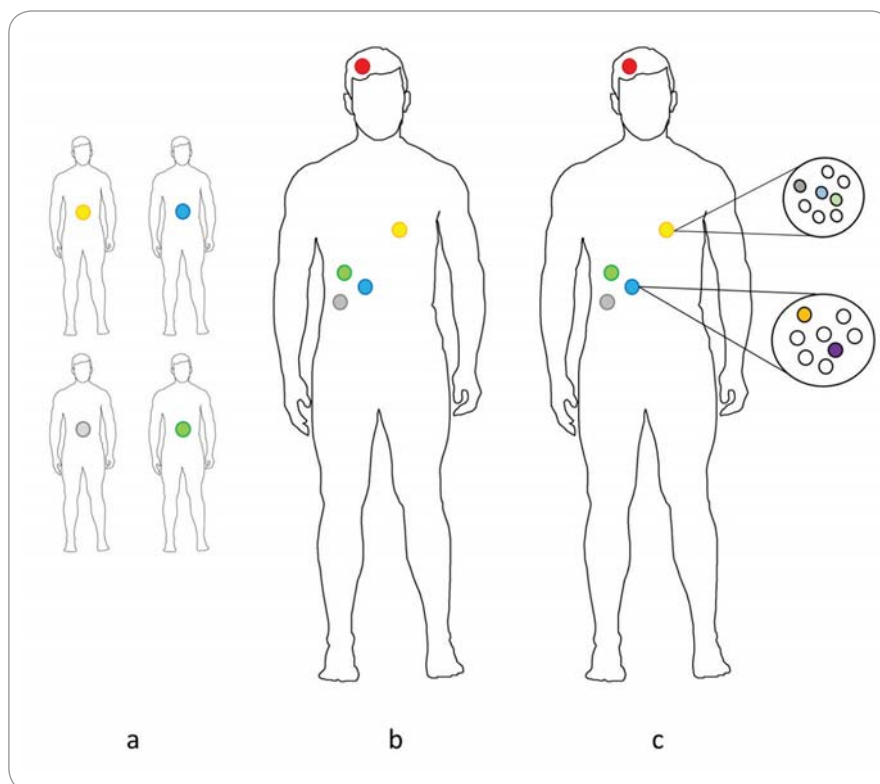
Kromě celkem přesně definovaných modelů může nádorová progresy probíhat i hybridním způsobem, kdy je paralelně aplikováno více modelů (může být typické pro určité skupiny mutací), nebo tyto modely mohou následovat v průběhu času (některé převažují v raných stadiích progresy) [71].

Fylogenetika nádorů

První pokusy využít fylogenetický model stromu v onkogenezi se objevily v 90. letech 20. století [72,73]. Tento druh analýzy dal postupně vzniknout novému odvětví označovanému jako nádorová fylogenetika. V současné době využívá nádorová fylogenetika mnohem sofistikovanější analytické přístupy, než tomu bylo na jejím počátku, a tento posun je také dokumentován narůstajícím množstvím publikací využívajících fylogenetické přístupy pro studium nádorových onemocnění za poslední 4 roky.

V současnosti dominuje představa darwinovské evoluce uplatňující se jako hlavní síla formující nádorovou heterogenitu, avšak tato teorie je v určitých směrech limitovaná. Její omezení vychází z rozdílných vlastností populací nádorových buněk a populací organismů. Nádorové buňky představují populaci s nepohlavním dělením (tzn. neprobíhá zde meiotická rekombinace, neuplatňuje se Hardy-Weinbergův zákon o frekvenci genotypů ani teorie pohlavního výběru), jejíž vývoj je ovlivňován evolučními procesy, které se projevují v normální populaci – mutace, genetický drift a přirozený výběr. Ačkoliv evoluční teorie značně pomáhá v pochopení dějů v průběhu nádorové progresse, rozdíly v evolučním procesu nádorů spočívají především v – 1. četnosti mutací; 2. míře selekce; 3. typicky vysoké heterogenitě vznikajících nádorových klonů a 4. typu vzniklé mutace [74].

Dominantním mechanismem evoluce druhů podle Darwina je selekce přirozeným výběrem. U nádorových buněk se jedná převážně o pozitivní selekci, která probíhá ve prospěch mutací podporujících všechny znaky nádorové buňky [75], zatímco negativní selekce je v průběhu vývoje nádoru velmi slabá. Toto také vysvětluje extrémní toleranci nádorových buněk k hypermutabilitě. Typickou vlastností nádorů je hypermutabilní fenotyp spojený s typem mutací, které nejsou časté při evoluci druhů. Hypermutabilita zahrnuje chromozomální nestabilitu (chromosomal instability – CIN), mikrosatelitovou nestabilitu (microsatellite instability – MIN), vysokou četnost bodových mutací a také CNV [74]. Kvantitativní hodnocení se-



Obr. 3. Klasifikace metod nádorové fylogenetiky na základě typu studie.

U kohortové studie (a) jsou jednotlivé nádory u odlišných jedinců (barevná kolečka) analyzovány jako by se jednalo o odlišné druhy. Studie nádorových regionů (b) vychází ze vzorků jediného pacienta, ale odlišných nádorových regionů primárního nádoru (zeleně, modře, šedě) nebo metastáz (červeně, žlutě). Analýza individuálních nádorových buněk (c) provádí fylogenetickou analýzu na základě variací mezi jednotlivými buňkami nádoru v jednom nebo více nádorových regionech (zeleně, modře, šedě (primární nádor), červeně, žlutě metastáza) [74].

lekce chybí – není známý počet mutací potřebný k rozvoji nádoru ani zda se liší mezi různými typy nádorového onemocnění [76]. Z hlediska evoluční teorie přirozeným výběrem je však třeba zdůraznit, že selektivní výhoda podle Darwina probíhá pouze na úrovni nádorové populace, a nikoliv na úrovni jedince – hostitele. V poslední době bylo publikováno i několik prací, které místo darwinovské evoluce nádorové heterogenity navrhují model neutrální evoluce (non-Darwinian model). Opět se tedy otevírá diskuze ohledně role selekcionismu a neutralizmu v procesu evoluce přirozeným výběrem, tentokrát však na úrovni nádorových buněk [59, 77–79].

Původně byly k sestavení fylogenetického stromu nádoru použity variace mikrosatelitových markerů u hereditárního nepolypózního karcinomu kolorekta [72]. V současnosti jsou k analýze

fylogenetických dat nádorů využívány počítačové metody, které pomáhají rekonstruovat evoluční procesy nádorů. Vstupní data pro fylogenetickou analýzu představuje genomový profil. Původně byla získána pomocí komparativní genomové hybridizace (comparative genomic hybridization – CGH) nebo fluorescenční *in situ* hybridizace (fluorescence *in situ* hybridization – FISH) [73,77], avšak postupně byly tyto metody vytlačeny NGS. Většina dat je vyhodnocována standardními algoritmy využívanými při fylogenetické analýze druhů, jako je metoda maximální úspornosti (maximal parsimony), metoda minimální evoluce (minimal evolution), metoda nejbližšího souseda (neighbour joining) nebo bayesovské metody stanovení fylogenetických vztahů [74].

Přístup k analýze fylogenetických dat nádorů vychází především z typu studie,

kerou může být – 1. kohortová studie zahrnující data z mnoha nádorů a popisující nejčastější dráhy progresu pro danou diagnózu (cross-cohort studies) (obr. 3a); 2. studie nádorových regionů pocházejících z odlišných lokalit jediného nádoru (regional bulk phylogenetics) (obr. 3b) nebo 3. analýza individuálních nádorových buněk získaných z jediného nádoru (single-cell tumour phylogenetics) (obr. 3c) [74]. Přehled dostupného softwaru pro analýzu fylogenetických dat členěný na základě typu studie je uveden v publikaci Schwartz et al [74].

Výstupní data pak představují fylogenetický strom, který odhaduje pořadí, ve kterém docházelo ke vzniku mutací v průběhu oddělování klonů v linii. Společné uzly fylogenetického stromu představují společné předky, jejichž genotyp může být vyvozen na základě společných rysů mezi jejich potomstvem [71].

Nádorová fylogenetika ukazuje minulost nádorů a pomáhá analyzovat data heterogenních nádorů. Pomocí tohoto přístupu je možné odhadnout načasování „driver“ mutací a zdůraznit tak klíčové události v iniciaci a progresi nádorového onemocnění. Velké kohortové studie mohou ukázat, které mutace v genech nebo drahách mají za následek vznik nádorového klonu (potenciálně dřívější události) nebo nádorového subklonu (pozdější události) [80].

Vnitřní nádorová heterogenita a metastazování

Metastazování je komplexní proces, při kterém jsou nádorové buňky uvolněny z primárního nádoru. Pokud přežijí transport, jsou lokalizovány na sekundárním místě, kde dochází k jejich adaptaci, proliferaci a vytvoření nádorové léze. Všechny kroky představují proces selekce, který je zdrojem heterogenity mezi primárním nádorem a metastázou [81]. Původní klasický model metastazování je jednoduchým lineárním modelem (viz kapitola Klonální evoluce nádorů), podle něhož primární nádor postupně získává vlastnosti potřebné pro diseminaci onemocnění a kolonizaci nové tkáně. Mnoho studií ukazuje vysokou genetickou podobnost mezi různými metastázami u jednoho pacienta. Tato skutečnost by tedy podporovala teorii, že

k diseminaci dochází v pozdních stádiích onemocnění (pozdní diseminace) [81]. Některé novější studie však ukazují, že některé nádory prsu a slinivky břišní jsou schopné diseminovat již v preneoplastickém stadiu (raná diseminace) [82,83]. V tomto případě jsou nádorové buňky distribuovány po těle hostitele v době, kdy samotné onemocnění není ještě diagnostikováno, a po variabilní době dormance se mohou začít vyvíjet nezávisle na primárním nádoru. Takové nádory sdílejí některé původní „driver“ mutace s primárním nádorem, avšak dále rozvíjejí svoji genetickou heterogenitu nezávisle na primárním nádoru a ostatních metastatických lézích a jsou navzájem vysoce heterogenní. Zvláštní případ představuje situace, kdy metastázy pocházejí ze subklonů odvětvených v raných fázích nádorové progresu, ale diseminovaných až v pozdní fázi. V tom případě jsou metastázy vysoce heterogenní vůči sobě samotným, avšak jejich genetická výbava je blízká primárnímu nádoru. Studie zabývající se metastazováním u kolorektálního karcinomu ukázaly, že model metastazování se může u jednotlivých pacientů lišit, tzn. ve skupině pacientů se stejnou diagnózou může docházet k ranému i pozdnímu diseminovanému onemocnění [84].

Kromě již uvedeného byla u melanomu pozorována genomová variabilita mezi lokoregionálními metastázami (pocházely z jediného subklonu primárního nádoru) a vzdálenými metastázami (pocházely z odlišných subklonů primárního nádoru) [85]. Celkově lze tedy říci, že jednotlivé případy metastazování jsou unikátní a je nemožné aplikovat univerzální model na všechny případy. Situace je však ještě komplikovanější, neboť kromě uvedených klasických cest, kdy vzniklé metastázy mají původ monoklonální, existují i mechanismy vedoucí ke vzniku polyklonálních metastáz [77].

Rozdíl v genomu primárního nádoru a metastázy představuje významný zdroj informací pro design anti-metastatické léčby. Genomová variabilita primárních nádorů kombinovaná s variabilitou vzniklou v důsledku dalších selekčních tlaků v mikroprostředí ve vzdálených orgánech hostitele vytváří obrovskou heterogenitu metastatického onemocnění,

kteřá způsobuje komplikace při nastavování vhodné léčby. Na základě mnoha studií je zjevné, že k úspěchu léčby metastatického onemocnění může přispět orgánově specifická léčba [86–89].

Heterogenita v diagnostice, terapii a lékové rezistenci

V současné době rostoucích požadavků na personalizovanou léčbu nádorového onemocnění představuje prostorová orientace a zastoupení nádorových subklonů v čase významnou výzvu pro správnou diagnostiku a léčbu nádorů [90]. Zatímco některé klony mohou být dominantními z hlediska fyzické entity nádoru, menší a často nedetekovatelné subklony mohou mít zásadní vliv na klinický průběh onemocnění, a to obzvláště u hematologických malignit [91,92].

Vnitřní faktory (genetická nestabilita, mutační rychlost a epigenetický status), stejně tak jako vnější faktory (vliv mikroprostředí a terapie) ovlivňují heterogenitu a odpověď na léčbu. Analýza patientských vzorků v průběhu času ukázala alterace v nádorovém genomu po aplikaci chemoterapeutik, což ukazuje, že i samotná léčba je odpovědná za výrazné změny v genomu nádorových buněk a může přímo přispívat k progresi onemocnění [20]. Většina terapeutických látek není schopna eliminovat veškeré nádorové buňky. Ty, které léčba nezasáhne, následně často vykazují ještě větší genetickou nestabilitu nebo rozvíjejí mechanismy odpovědné za rezistenci (samotné zvýšení genetické nestability nedává nádorovým buňkám selektivní výhodu, a naopak může být fatální v případě, že překročí práh životaschopnosti). Z toho důvodu správně odhalená genotypová a fenotypová variace mezi jednotlivými nádorovými buňkami v rámci nádorové tkáně a míra heterogenity může sloužit jako vhodný diagnostický nástroj a prediktivní biomarker [93]. Experimentálně bylo prokázáno, že množství genetických změn v nádorových subpopulacích primárního karcinomu prsu koreluje s klinicko-patologickými rysy [94,95] a vyšší míra heterogenity koreluje s horší prognózou, např. u pacientů s karcinomem hlavy a krku nezávisle na proběhlé infekci lidským papilomavirem [96,97].

Nádorová heterogenita je dynamickou vlastností nádoru, která vychází z adaptace buněk na změny a z neustálé klonální selekce. Mechanismus lékové rezistence u cílené terapie často zahrnuje vznik sekundárních mutací a aktivaci drah přežití v cílových buňkách nebo pozitivní selekci klonů, které neexprimují cílovou molekulu. Adaptace a nikoliv eliminace buněk vystavených léčivé látce může být způsobena nejen genetickými mechanizmy, ale také mechanizmy epigenetickými [98].

V poslední době se ukazují testování metodou tzv. „tekuté biopsie“ jako velice slibný přístup monitorování dynamiky nádorového onemocnění. Tento neinvazivní přístup využívá analýzu cirkulujících nádorových buněk (circulating tumor cells – CTCs) nebo cirkulující volné nádorové DNA (circulating tumor DNA – ctDNA) k cílené detekci konkrétních změn v sekvenci DNA nebo identifikaci celého spektra nádorových mutací. Ve vztahu k nádorové heterogenitě představuje ctDNA směsný marker odlišných nádorových klonů a podává přesnější informaci o nádorovém ložisku z hlediska genomové diverzity ve srovnání s jednotlivými nádorovými vzorky. Omezení však spočívá především v nízké senzitivitě u méně objemných nádorových ložisek. Analýza CTCs a ctDNA umožňuje v reálném čase sledovat klinickou progresi a odpověď na léčbu u nádorových diagnóz, jako je karcinom prsu, kolorekta, plic a dalších [99–100].

Závěr

Nádorový genom je formován třemi základními evolučními činiteli, jako je mutace, která dává vznik nové variantě v populaci, selekce a drift, které umožní její expanzi. Analýza genomických dat nám dovoluje sledovat tyto evoluční procesy, neboť historie nádorové evoluce je vepsána do genomu nádorové buňky. Fylogenetické analýzy pomáhají odhalit mechanismy odpovědné za vznik heterogenity, dynamiku, kterou se vyvíjejí a nové prognostické ukazatele, avšak doposud se ve většině případů jedná o retrospektivní studie. Znalosti získané těmito studiemi umožňující stanovení klonálního statusu nádorové heterogenity, její dynamiky a identifikace

rizikových subklonů, které by byly cílem protinádorové léčby, je potřeba aplikovat a testovat v klinické praxi na velkých souborech vzorků.

Fenotypová diverzita přítomná u geneticky heterogenních primárních nádorů nebo příp. diseminovaného onemocnění představuje komplikaci pro komplexní terapeutické procesy. Pro kompenzaci diagnostické variability způsobené heterogenním zastoupením nádorových subklonů v jednotlivých oblastech nádoru (sampling error) je třeba analyzovat větší množství regionálních vzorků nádorové tkáně. Exaktní identifikace složek nádorové tkáně je zásadní z hlediska stanovení vhodného terapeutického přístupu, neboť jednotlivé subklony mohou mít odlišné biologické vlastnosti a ve svém důsledku i odpověď k léčbě.

Literatura

- Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975; 255(5505): 197–200.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194(4260): 23–28.
- Sottoriva A, Barnes CP, Graham TA. Catch my drift? Making sense of genomic intra-tumour heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1867(2): 95–100. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.12.003.
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(12): 924–935. doi: 10.1038/nrc2013.
- Navin NE, Hicks J. Tracing the tumor lineage. *Mol Oncol* 2010; 4(3): 267–283. doi: 10.1016/j.molonc.2010.04.010.
- Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer* 2013; 108(3): 479–485. doi: 10.1038/bjc.2012.581.
- McGranahan N, Swanton C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present and the future. *Cell* 2017; 168(4): 613–628. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.018.
- Cancer.org. [online]. The history of cancer. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer.html>.
- Hansmann's ideas of the nature of cancer: description and analysis. In: Bignold LP, Coghlan BL, Jersmann HPA (eds). David Paul Von Hanseman: contributions to oncology. Basel: Birkhäuser 2007: 75–90.
- Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res* 1984; 44(6): 2259–2265.
- Epstein JI, Egevad L, Amin MB et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol* 2016; 40(2): 244–252. doi: 10.1097/PAS.0000000000000530.
- Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1805(1): 105–117. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.11.002.
- Michor F, Polyak K. The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3(11): 1361–1364. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0234.
- Heppner GH, Miller BE. Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev* 1983; 2(1): 5–23.

- Burrell RA, McGranahan N, Bartek J et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013; 501(7467): 338–345. doi: 10.1038/nature12625.
- Gerashchenko TS, Denisov EV, Litviakov NV et al. Intratumor heterogeneity: nature and biological significance. *Biochemistry (Mosc)* 2013; 78(11): 1201–1215. doi: 10.1134/S0006297913110011.
- Merid SK, Goranskaya D, Alexeyenko A. Distinguishing between driver and passenger mutations in individual cancer genomes by network enrichment analysis. *BMC Bioinformatics* 2014; 15: 308. doi: 10.1186/1471-2105-15-308.
- Kim YA, Cho DY, Przytycka TM. Understanding genotype-phenotype effects in cancer via network approaches. *PLoS Comput Biol* 2016; 12(3): e1004747. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004747.
- Rosenthal R, McGranahan N, Herrero J et al. Deciphering genetic intratumor heterogeneity and its impact on cancer evolution. *Annu Rev Cancer Biol* 2017; 1: 223–240. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-042516-011348.
- Pleasant ED, Cheetham RK, Stephens PJ et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 2010; 463(7278): 191–196. doi: 10.1038/nature08658.
- International Cancer Genome Consortium, Hudson TJ, Anderson W et al. International network of cancer genome projects. *Nature* 2010; 464(7291): 993–998. doi: 10.1038/nature08987.
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 150(2): 251–263. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.024.
- Cancer Genome Atlas Research Network, McLendon R, Friedman A et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455(7216): 1061–1068. doi: 10.1038/nature07385.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Collisson EA et al. Cancer genome atlas research network. the cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nat Genet* 2013; 45(10): 1113–1120. doi: 10.1038/ng.2764.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Agrawal N, Akbani R et al. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014; 159(3): 676–690. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.050.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013; 499(7457): 214–218. doi: 10.1038/nature12213.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE et al. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339(6127): 1546–1558. doi: 10.1126/science.1235122.
- Solimani NL, Xu Q, Mermel CH et al. Recurrent hemizygous deletions in cancers may optimize proliferative potential. *Science* 2012; 337(6090): 104–109. doi: 10.1126/science.1219580.
- Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301(5895): 89–92.
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR et al. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 1985; 228(4696): 187–190.
- Greger V, Debus N, Lohmann D et al. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet* 1994; 94(5): 491–496.
- Graff JR, Gabrielson E, Fujii H et al. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 2000; 275(4): 2727–2732.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-

- defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57(5): 808–811.
34. Mack SC, Hubert CG, Miller TE et al. An epigenetic gateway to brain tumor cell identity. *Nat Neurosci* 2015; 19(1): 10–19. doi: 10.1038/nn.4190.
35. Mazar T, Pankov A, Johnson BE et al. DNA methylation somatic mutations converge on the cell cycle and define similar evolutionary histories in brain tumors. *Cancer Cell* 2015; 28(3): 307–317. doi: 10.1016/j.ccell.2015.07.012.
36. Aryee MJ, Liu W, Engelmann JC et al. DNA methylation alterations exhibit intraindividual stability and inter-individual heterogeneity in prostate cancer metastases. *Sci Transl Med* 2013; 5(169): 169ra110. doi: 10.1126/scitranslmed.3005211.
37. Marusyk A, Almendro V, and Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012; 12(5): 323–334. doi: 10.1038/nrc3261.
38. Kreso A, O'Brien CA, van Galen P et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* 2013; 339(6119): 543–548. doi: 10.1126/science.1227670.
39. Katz E, Skorecki K, Tzukerman M. Niche-dependent tumorigenic capacity of malignant ovarian ascites-derived cancer cell subpopulations. *Clin Cancer Res* 2009; 15(1): 70–80. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1233.
40. Abelson S, Shamai Y, Berger L et al. Intratumoral heterogeneity in the self-renewal and tumorigenic differentiation of ovarian cancer. *Stem Cells* 2012; 30(3): 415–424. doi: 10.1002/stem.1029.
41. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med* 2015; 21(8): 846–853. doi: 10.1038/nm.3915.
42. Burrell RA, Swanton C. Re-evaluating clonal dominance in cancer evolution. *Trends Cancer* 2016; 2(5): 263–276. doi: 10.1016/j.trecan.2016.04.002.
43. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805(1): 105–117. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.11.002.
44. Marusyk A, Tabassum D, Altmock P. Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. *Nature* 2014; 514(7520): 54–58. doi: 10.1038/nature13556.
45. Cleary AS, Leonard TL, Gestl SA et al. Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature* 2014; 508(7494): 113–117. doi: 10.1038/nature13187.
46. Keats JJ, Chesi M, Egan JB et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012; 120(5): 1067–1076. doi: 10.1182/blood-2012-01-405985.
47. Kim T, Yoshida K, Kim YK et al. Clonal dynamics in a single AML case tracked for 9 years reveals the complexity of leukemia progression. *Leukemia* 2015; 30(2): 295–302. doi: 10.1038/leu.2015.264.
48. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013; 499(7457): 214–218. doi: 10.1038/nature12213.
49. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun* 2014; 5: 2997. doi: 10.1038/ncomms3997.
50. Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759–767.
51. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell* 2012; 149(5): 994–1007. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.023.
52. Shah SP, Roth A, Goya R et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012; 486(7403): 395–399. doi: 10.1038/nature10933.
53. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366(10): 883–892. doi: 10.1056/NEJMoa1113205.
54. McPherson A, Roth A, Laks E et al. Divergent modes of clonal spread and intraperitoneal mixing in high-grade serous ovarian cancer. *Nat Genet* 2016; 48(7): 758–767. doi: 10.1038/ng.3573.
55. Wang Y, Waters J, Leung ML et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* 2014; 512(7513): 155–160. doi: 10.1038/nature13600.
56. Kim TM, Jung SH, An CH et al. Subclonal genomic architectures of primary and metastatic colorectal cancer based on intratumoral genetic heterogeneity. *Clin Cancer Res* 2015; 21(19): 4461–4472. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2413.
57. Yates LR, Gerstung M, Knappskog S et al. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multi-region sequencing. *Nat Med* 2015; 21(7): 751–759. doi: 10.1038/nm.3886.
58. Boutros PC, Fraser M, Harding NJ et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet* 2015; 47(7): 736–745. doi: 10.1038/ng.3315.
59. Ling S, Hu Z, Yang Z et al. Extremely high genetic diversity in a single tumor points to prevalence of non-Darwinian cell evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(47): E6496–E6505. doi: 10.1073/pnas.1519556112.
60. Kang H, Salomon MP, Sottoriva A et al. Many private mutations originate from the first few divisions of a human colorectal adenoma. *J Pathol* 2015; 237(3): 355–362. doi: 10.1002/path.4581.
61. Sottoriva A, Kang H, Ma Z et al. A big bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet* 2015; 47(3): 209–216. doi: 10.1038/ng.3214.
62. Bashashati A, Ha G, Tone A et al. Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *J Pathol* 2013; 231(1): 21–34. doi: 10.1002/path.4230.
63. Harbst K, Lauss M, Cirenajwis H et al. Multiregion whole-exome sequencing uncovers the genetic evolution and mutational heterogeneity of early-stage metastatic melanoma. *Cancer Res* 2016; 76(16): 4765–4774. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3476.
64. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinoma defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* 2014; 46(3): 225–233. doi: 10.1038/ng.2891.
65. Thirlwell C, Will OC, Domingo E et al. Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. *Gastroenterology* 2010; 138(4): 1441–1454. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.033.
66. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 2010; 467(7319): 1109–1113. doi: 10.1038/nature09460.
67. Shah SP, Roth A, Goya R et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012; 486(7403): 395–399. doi: 10.1038/nature10933.
68. Williams MJ, Werner B, Barnes CP et al. Identification of neutral tumor evolution across cancer types. *Nat Genet* 2016; 48(3): 238–244. doi: 10.1038/ng.3489.
69. Baca SC, Prandi D, Lawrence MS. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 2013; 153(3): 666–677. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.021.
70. Gao R, Davis A, McDonald TO et al. Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple-negative breast cancer. *Nat Genet* 2016; 48(10): 1119–1130. doi: 10.1038/ng.3641.
71. Davis A, Gao R, Navin N. Tumor evolution: linear, branching, neutral or punctuated? *Biochim Biophys Acta* 2017; 1867(2): 151–161. doi: 10.1016/j.bbcan.2017.01.003.
72. Tsao J, Zhang J, Salvoara R et al. Tracing cell fates in human colorectal tumors from somatic microsatellite mutations: evidence of adenomas with stem cell architecture. *Am J Pathol* 1998; 153(4): 1189–1200. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65663-5.
73. Desper R, Jiang F, Kallioniemi OP et al. Inferring tree models of oncogenesis from comparative genomic hybridization data. *J Comput Biol* 1999; 6(1): 37–51. doi: 10.1089/cmb.1999.6.37.
74. Schwartz R, Schäffer AA. The evolution of tumour phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet* 2017; 18(4): 213–229. doi: 10.1038/nrg.2016.170.
75. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
76. Martincorena I, Raine KM, Gerstung M et al. Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. *Cell* 2017; 171(5): 1029–1041. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.042.
77. Wang HY, Chen Y, Tong D et al. Is the evolution in tumors Darwinian or non-Darwinian? *National Science Review* 2018; 5(1): 15–17.
78. Williams MJ, Werner B, Barnes CP et al. Identification of neutral tumor evolution across cancer types. *Nat Genet* 2016; 48(3): 238–244. doi: 10.1038/ng.3489.
79. Williams MJ, Werner B, Barnes CP et al. Reply: Is the evolution of tumors Darwinian or non-Darwinian? *National Science Review* 2018; 5(1): 17–19. doi: 10.1093/nsr/nwx131.
80. Pennington G, Smith CA, Shackney S et al. Reconstructing tumor phylogenies from heterogeneous single-cell data. *J Bioinform Comput Biol* 2007; 5(2a): 407–427.
81. Hunter KW, Amin R, Deasy S et al. Genetic insights into the morass of metastatic heterogeneity. *Nat Rev Cancer* 2018; 18(4): 211–223. doi: 10.1038/nrc.2017.126.
82. Weng D, Penzner JH, Song B et al. Metastasis is an early event in mouse mammary carcinomas and is associated with cells bearing stem cell markers. *Breast Cancer Res* 2012; 14(1): R18. doi: 10.1186/bcr3102.
83. Rhim AD, Thege FI, Santana SM et al. Detection of circulating pancreatic epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology* 2014; 146(3): 647–651. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.007.
84. Xie T, Cho YB, Wang K et al. Patterns of somatic alterations between matched primary and metastatic colorectal tumors characterized by whole-genome sequencing. *Genomics* 2014; 104(4): 234–241. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.07.012.
85. Sanborn JZ, Chung J, Purdom E et al. Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(35): 10995–11000. doi: 10.1073/pnas.1508074112.
86. Naxerova K, Reiter JG, Brachtel E et al. Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. *Science* 2017; 357(6346): 55–60. doi: 10.1126/science.aai8515.
87. Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 2015; 520(7547): 353–357. doi: 10.1038/nature14347.
88. Brastianos PK, Carter SL, Santagata S et al. Genomic characterization of brain metastases reveals branched evolution and potential therapeutic targets. *Cancer Discov* 2015; 5(11): 1164–1177. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0369.
89. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 2010; 467(7319): 1109–1113. doi: 10.1038/nature09460.
90. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell* 2015; 27(1): 15–26. doi: 10.1016/j.ccell.2014.12.001.
91. Mullighan CG, Phillips LA, Su X et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008; 322(5906): 1377–1380. doi: 10.1126/science.1164266.

92. Ding L, Ley TJ, Larson DE et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012; 481(7382): 506–510. doi: 10.1038/nature10738.
93. Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu Rev Pathol* 2013; 8: 277–302. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-163923.
94. Park SY, Gönen M, Kim HJ et al. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. *J Clin Invest* 2010; 120(2): 636–644. doi: 10.1172/JCI40724.
95. Seol H, Lee HJ, Choi Y et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol* 2012; 25(7): 938–948. doi: 10.1038/modpathol.2012.36.
96. Mroz EA, Tward AM, Hammon RJ et al. Intra-tumor genetic heterogeneity and mortality in head and neck cancer: analysis of data from the cancer genome atlas. *PLoS Med* 2015; 12(2): e1001786. doi: 10.1371/journal.pmed.1001786.
97. Ledgerwood LG, Kumar D, Eterovic AK et al. The degree of intratumor mutational heterogeneity varies by primary tumor sub-site. *Oncotarget* 2016; 7(19): 27185–27198. doi: 10.18632/oncotarget.8448.
98. Sharma SV, Lee DY, Li B et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 2010; 141(1): 69–80. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.027.
99. De Mattos-Arruda L, Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol Oncol* 2016; 10(3): 464–474. doi: 10.1016/j.molonc.2015.12.001.
100. Hench IB, Hench J, Tolnay M. Liquid biopsy in clinical management of breast, lung, and colorectal cancer. *Front Med* 2018; 5: 9. doi: 10.3389/fmed.2018.00009.

Využití mitochondriálních procesů v cílené terapii nádorových onemocnění

Mitochondrial Processes in Targeted Cancer Therapy

Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Při vzniku a vývoji nádoru dochází k adaptaci řady buněčných funkcí novým potřebám transformované buňky a k podstatným změnám dochází i v mitochondriích. Tato organela je částečně odstavena z energetického metabolismu a nádorové buňky tak získávají významný podíl energie z glykolýzy i v aerobním prostředí. Mitochondrie je však intenzivně využívána k produkci metabolitů potřebných pro růst a proliferaci. Mutace a změny v expresi enzymů citrátového cyklu mohou navíc přímo přispívat k nádorové transformaci produkcí onkometabolitů. Apoptotická dráha, ve které hrají mitochondrie důležitou roli, je přerušena a buňka neodpovídá na signalizaci vedoucí k programované buněčné smrti. Tyto rozdíly ve fungování mitochondriálních procesů mezi zdravými a nádorovými buňkami vedly k myšlence cílit protinádorovou terapii na tuto organelu. Doposud se podařilo identifikovat řadu enzymů, signálních molekul a membránových přenašečů, které by mohly být pro vývoj terapie vhodnými cíli. Přestože výzkum v této oblasti probíhá již delší dobu, teprve v posledních letech byla úspěšně testována a schválena první léčiva pro klinickou praxi. Nová léčiva venetoklax a enasidenib jsou příkladem dvou odlišných přístupů, venetoklax cílí na apoptotickou dráhu a enasidenib na metabolické procesy. Obě látky však dokazují, že cílení na mitochondriální procesy je využitelné v terapii nádorových onemocnění. **Cíl:** Cílem této práce je poskytnout přehled o vývoji protinádorových léčiv zacílených na mitochondriální procesy. Práce se věnuje několika hlavním oblastem vývoje, v rámci kterých jsou zmíněny uplatňované výzkumné strategie. Popisuje buněčné komponenty, které jsou studovány jako vhodné cíle a také látky, které jsou potenciálně využitelné nebo již schválené pro použití v terapii nádorových onemocnění.

Klíčová slova

nádory – cílená molekulární terapie – mitochondrie – protinádorové látky – výzkum

Summary

Background: During tumor initiation and progress, cellular functions adapt to the new needs of the transformed cells and mitochondrial processes are also affected. Mitochondria are less extensively used for supplying cells with energy; rather, cancer cells utilize glycolysis to a much greater extent, even under aerobic conditions. Mitochondria produce metabolites required for cellular growth and proliferation. Mutations and alterations in gene expression of citrate cycle enzymes can directly contribute to transformation through the production of oncometabolites. The apoptotic pathway in which mitochondria play a critical role is disrupted in cancer cells, resulting in cells that do not respond to programmed cell death signaling. These differences between mitochondrial processes in healthy and diseased cells suggest they could be used in mitochondria-targeted therapies. To date, many potential molecular targets have been identified, including enzymes, signaling molecules, and membrane transporters. Even though this field has been studied for years, the first drugs, venetoclax and enasidenib, were only approved in the last two years and are the result of two different research approaches. Venetoclax targets the apoptotic pathway and enasidenib targets metabolic processes. The discovery of these two compounds demonstrates that it is possible to develop mitochondria-targeted cancer treatments. **Purpose:** The purpose of this article is to provide an overview of research in the field of mitochondria-targeting therapies for cancer. The main areas of research and the main approaches for treatment development are summarized. Cellular components studied as potential targets for therapy and compounds that are considered exploitable are described, as well as already approved drugs.

Key words

neoplasms – molecular targeted therapy – mitochondria – antineoplastic agents – research

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Radovan Krejčíř
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: radovan.krejcir@mou.cz

Přijato/Accepted: 3. 8. 2018

doi: 10.14735/amko20182514

Úvod

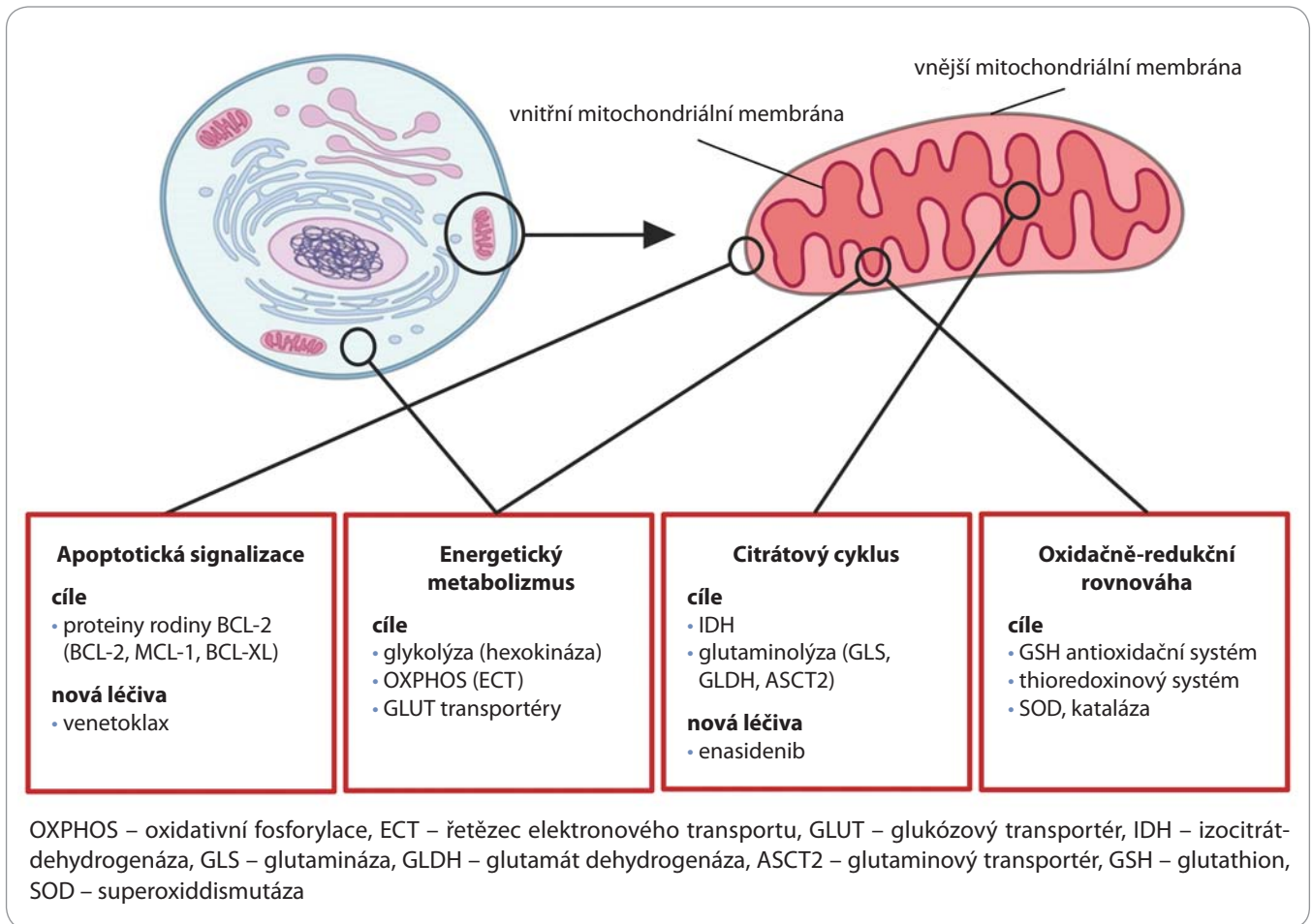
Mitochondrie je organela, která je centrem energetického metabolismu buňky. Uvnitř mitochondrie probíhá oxidativní fosforylace (oxidative phosphorylation – OXPHOS), která je součástí procesu buněčného dýchání. Buněčné dýchání umožňuje buňce efektivně zpracovávat glukózu a získávat z ní maximum využitelné energie. Součástí buněčného dýchání je i citrátový nebo také Krebsův cyklus (citrate cycle – CitC), cyklus enzymatických reakcí lokalizovaný v mitochondriální matrix, kde dochází k produkci redukovaných kofaktorů nezbytných k regeneraci adenosin trifosfátu (adenosine triphosphate – ATP). V CitC jsou dále vytvářeny metabolity, které slouží jako prekurzory pro syntézu aminokyselin, nukleotidů a lipidů. Mimo metabolické pochody má mitochondrie zásadní úlohu v procesu programované buněčné smrti, apoptóze.

Změny ve fungování mitochondriálních procesů mohou mít značný vliv na životaschopnost a chování buněk a jsou typické pro nádorové buňky [1]. Léčiva schválená pro klinické použití v posledních letech dokazují, že nádorové adaptace mitochondriálních funkcí je možné využít v cílené terapii nádorových onemocnění. Výzkum v této oblasti probíhá již delší dobu a vzešla z něj řada kandidátů pro klinické testy, první úspěchy však pocházejí až z nedávné doby. V současnosti jsou studovány možnosti cílení jednotlivých mitochondriálních procesů, mezi které patří apoptotická signalizace, energetický metabolismus, CitC a také oxidačně-redukční rovnováha nádorových buněk (obr. 1).

Apoptotická signalizace

Apoptóza je základním typem programované buněčné smrti a pro lidský organismus je jednou z přirozených bariér

proti vzniku a rozvoji nádorových onemocnění. Úlohou apoptózy je odstranění nepotřebných nebo potenciálně nebezpečných buněk z organismu. Aktivace apoptotické kaskády má za následek částečný rozklad buněčných komponent a fragmentaci buňky na tzv. apoptotická tělíska, která jsou pohlcena okolními buňkami. Při apoptóze proto nedochází (na rozdíl od nekrózy) k uvolnění buněčného obsahu do mezibuněčného prostoru a spuštění zánětlivé reakce. Během vývoje nádoru čelí nádorová buňka mnoha pokusům o vyvolání apoptózy. Rozlišujeme mezi tzv. vnitřní a vnější apoptotickou dráhou, které jsou spuštěny odlišnými mechanismy. Vnější dráha je zahájena mezibuněčnou signalizací ze strany imunitních buněk, zatímco vnitřní dráhu spouští regulační mechanismy buňky samotné. K rozhodnutí o spuštění vnitřní dráhy potom dochází na vnější mitochondriální membráně.



Obr. 1. Přehled strategií pro cílení mitochondriálních procesů v terapii nádorů.

Molekulárním mechanismem, který spouští vnitřní apoptotickou dráhu, je vychýlení rovnováhy mezi proapoptotickými a antiapoptotickými proteiny rodiny BCL-2 v cytosolu. Proteinová rodina BCL-2 tvoří systém, který integruje podněty z řady buněčných procesů a signálních drah a hladiny jednotlivých proteinů kolísají v závislosti na mnoha faktorech. Pokud je buňka v pořádku, převažuje signalizace pro přežití a antiapoptotické molekuly brání spuštění apoptózy. Pokud však dojde k dostatečné expresi proapoptotických proteinů označovaných jako „BH3-only“, antiapoptotické proteiny BCL-2, BCL-XL a MCL-1 jsou vyváženy z interakce s proteiny BAX a BAK. Uvolněné proteiny BAX a BAK poté oligomerizují a vytváří pór ve vnější mitochondriální membráně. V důsledku toho dochází k přesunu mitochondriálního proteinu cytochromu C do cytoplazmy, tvorbě apoptozomu a spuštění apoptotické kaskády [2].

Ke vzniku nádoru může dojít tehdy, pokud nádorová buňka dokáže obejít apoptotickou signalizaci a vyhnout se apoptóze. Nádorové buňky využívají různé způsoby, jak toho docílit, přičemž jedním z rozšířených mechanismů je zvýšená exprese antiapoptotických proteinů rodiny BCL-2 [3]. Specifické inhibitory těchto proteinů jsou proto cílem vývoje protinádorové terapie a jsou známy jako BH3 mimetika, protože napodobují úlohu proapoptotických proteinů „BH3-only“ [4]. Výzkum v oblasti BH3 mimetik přinesl první úspěch v roce 2016, kdy nízkomolekulární látka venetoklax prošla úspěšně klinickým testováním a byla schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration – FDA) [5]. Lék byl určen pacientům s chronickou lymfocytární leukémií a delecí krátkého raménka chromozomu 17, na kterém se nachází gen *TP53* kódující nádorový supresor p53. V červnu 2018 byl potom venetoklax schválen v kombinaci s rituximabem i pro pacienty bez této delecce. Venetoklax má za sebou zajímavý vývoj. Jeho předchůdcem byla jiná látka, navitoklax, která však musela být z klinického testování stažena, protože u pacientů způsobovala vážnou dávku limitující trombocytopenii. Později se ukázalo, že problém navitoklaxu spočí-

val v jeho nedostatečné specifitě. Navitoklax byl tzv. polyselektivním inhibitorem s afinitou ke dvěma antiapoptotickým proteinům BCL-2 a BCL-XL současně. Venetoklax byl proto navržen jako monoselektivní s afinitou pouze pro BCL-2. Tím vzniklo dostatečně široké terapeutické okno pro léčbu nádorových onemocnění s typicky zvýšenou expresí tohoto proteinu. Zdravé buňky, u kterých jsou antiapoptotické proteiny zastoupeny rovnoměrně jsou vůči inhibitoru méně citlivé než buňky závislé zejména na proteinu BCL-2. Monoselektivní inhibitory proteinů BCL-X_L a MCL-1 jsou v současnosti ve fázi vývoje [4].

Energetický metabolismus – glykolýza a příjem glukózy

Jednou z prvních známých vlastností nádorových buněk byla jejich zvýšená glykolytická aktivita. Nádorové buňky získávají velkou část energie z glykolýzy i za přítomnosti kyslíku. Důsledkem intenzivní glykolýzy v buňce je hromadění jejího koncového produktu, pyruvátu, který není dostatečně rychle odbouráván v CitC. Místo toho je pyruvát metabolizován na laktát, jehož hladina bývá v nádorové tkáni zvýšená. Tento jev je známý jako Warburgův efekt a byl popsán téměř před 100 lety [6]. Ve zdravých buňkách je glykolýza hlavním zdrojem energie pouze při nedostatku kyslíku, a nádorové buňky tak napodobují anaerobní metabolismus. Warburgův efekt dal podnět k teorii, podle které byla ztráta funkčních mitochondrií primární příčinou nádorového bujení. Později se však ukázalo, že k úplné inhibici OXPHOS dochází v nádorech jen vzácně a k pochopení Warburgova efektu je potřeba brát v úvahu celý kontext metabolických změn v nádorové buňce [7,8]. Díky tomu, že zvýšená glykolytická aktivita je všeobecně rozšířenou vlastností nádorových buněk, stalo se zablokování glykolýzy zajímavým cílem pro vývoj onkologické léčby. Glykolýza samotná neprobíhá v mitochondriích, je však součástí energetického metabolismu buňky a s mitochondriálními procesy je úzce spjatá.

Jednou z nejméně studovaných možností, jak potlačit glykolýzu, je inhibice prvního enzymu glykolytické kaskády –

hexokinázy (HK). HK fosforyluje glukózu za vzniku glukóza-6-fosfátu a patří mezi několik enzymů, jejichž aktivita je regulovaná a rozhoduje o celkovém výkonu glykolýzy. Inhibicí HK je možné zastavit celý proces a zabránit buňce v produkci ATP přeměnou glukózy na pyruvát. HK bývá v nádorech přítomná ve zvýšené míře, a to zejména v podobě izoenzymu HKII. Tato varianta se v dospělém lidském organismu vyskytuje jen v některých tkáních a její unikátní vlastností je vazba na vnější mitochondriální membránu [9]. Vyšší exprese HK a dalších limitujících enzymů umožňuje nádorové buňce navýšit kapacitu glykolytické kaskády a v případě dostatečného množství glukózy získávat z glykolýzy více ATP. Podle některých studií mohou být nádorové buňky na HKII závislé a její inhibice by tak mohla být úspěšnou terapeutickou strategií [10]. Podařilo se objevit několik látek, které blokují glykolýzu prostřednictvím inhibice HK, ale žádná z nich nebyla úspěšně klinicky testována. Mezi ty nejzajímavější patří lonidamin a 3-bromopyruvát [11]. Účinek 3-bromopyruvátu pravděpodobně souvisí s jeho schopností blokovat vazbu HKII na mitochondriální membránu [12]. Dalšími vhodnými cíli pro inhibici glykolýzy jsou pyruvátkináza a fosfofruktokináza. Jejich aktivita patří podobně jako v případě HK k regulovaným krokům glykolytické kaskády, a také tyto enzymy bývají v nádorech přítomny jako určitá preferovaná varianta [7]. Ideálním inhibitorem by tak byla látka, která by dokázala specificky blokovat danou izoformu nebo izoenzym.

Glykolýza je energeticky méně efektivní způsob využití glukózy ve srovnání s OXPHOS, a nádorové buňky proto musí přijímat glukózu v mnohem větším množství. Na tuto situaci se adaptují zvýšenou expresí glukózových transportérů (GLUT, alt. SLC2A) na buněčné membráně [13]. Těto vlastnosti se úspěšně využívá v diagnostice nádorů (pozitronová emisní tomografie) a objevily se pokusy o její využití ve vývoji terapie. V lidské buňce bylo popsáno čtrnáct různých glukózových transportérů, přičemž přesná úloha a výskyt v organismu jsou známy jen u některých z nich [14]. V nádorových buňkách typicky dochází

k navýšení transportéru GLUT1, který je přirozeně rozšířený napříč buněčnými typy, a méně také GLUT3, který je specifický pro neurony [15]. Pro využití v terapii byl testován glukózový analog 2-deoxyglukóza (2-DG). Tato látka je v buňce fosforylovaná HK za vzniku 2-deoxyglukóza-6-fosfátu, který je kompetitivním inhibitorem dalších enzymů glykolytické kaskády. Množství 2-DG přijaté buňkou je přitom přímo úměrné množství glukózových transportérů na membráně. Zajímavé výsledky z laboratoře se však nepotvrdily v klinických testech. Jedním z problémů 2-DG je nutný příjem velkého množství látky pro kompetitivní inhibici enzymů, jejichž přirozený substrát (glukóza) je v krvi přítomný v milimolárním množství [16]. Látka se ale jeví jako potenciálně zajímavá pro použití v kombinaci s dalšími léčivy. Snížené množství glukózy totiž navozuje klidový režim, při kterém buňka šetří zdroje energie. Byly publikovány studie, podle kterých by navození tohoto stavu ve zdravých buňkách mohlo přispět k jejich ochraně před cytotoxickými účinky jiných léčiv. Naopak nádorové buňky, které by nedokázaly v odpovědi na nedostatek glukózy zpomalit metabolismus a zastavit proliferaci, by mohly být vůči těmto léčivům citlivější [17].

Energetický metabolismus – oxidativní fosforylace

V kontextu energetického metabolismu se výzkum protinádorových léčiv neomezuje pouze na glykolýzu, ale objevují se také studie zaměřené na OXPHOS a další fáze buněčného dýchání. Buněčné dýchání zahrnuje procesy glykolýzy, dekarboxylace pyruvátu komplexem enzymu pyruvátdehydrogenázy, CitC a OXPHOS. Souhrnným výtěžkem těchto procesů je až 38 molekul ATP, tedy téměř 20násobek výtěžku z glykolýzy samotné. Za aerobních podmínek zdravá buňka dále využívá pyruvát vzniklý glykolýzou, který je přeměněn na acetylkoenzym A (AcetA) a ten poté vstupuje do CitC. V CitC dochází sérií enzymatických procesů k produkci redukováných kofaktorů NADH a FADH₂, které jsou následně využity v řetězci elektronového transportu (electron transport chain – ETC). ETC je systém proteinových

komplexů lokalizovaný na vnitřní mitochondriální membráně, který vytváří protonový gradient mezi vnitřní a vnější membránou této organely. Protonový gradient je následně využíván ATP syntázou ke tvorbě ATP.

Nejzajímavější látkou, která ovlivňuje fungování ETC a která je studována v souvislosti s rakovinou, je lék na diabetes mellitus 2. typu, metformin. Myšlenka na možné uplatnění metforminu v onkologii vzešla z epidemiologických studií na pacientech s diabetem. Tyto studie poukazují na nižší incidenci nádorových onemocnění (snížení o 31 %) u diabetiků léčených metforminem ve srovnání s diabetiky léčenými jiným způsobem [18]. Není dosud jasné, jaký je mechanismus protektivního účinku této látky. Obecně je metformin považován za inhibitor komplexu I ETC, který narušuje proces OXPHOS. Jeho účinek na organismus je však komplexní a látka působí na několika úrovních [19]. Působením metforminu dochází v buňce k aktivaci AMP-aktivované kinázy (AMPK). Ta je důležitým regulátorem buněčného metabolismu a k její aktivaci dochází při snížení hladiny ATP. AMPK navozuje v buňce klidový stav, kdy buňka šetří energetické zdroje, dochází k potlačení růstu a navození autofagie. Jedním z možných vysvětlení protinádorového působení metforminu je proto útlum metabolismu nádorových buněk. Na úrovni celého organismu metformin potlačuje glukoneogenezi v játrech, snižuje koncentraci glukózy a hladinu inzulínu v krvi. Tyto účinky mohou vést k energetickému stresu nádorových buněk a také k omezení prorůstové signalizace u nádorů využívajících inzulín a inzulínu podobné růstové faktory (insuline-like growth factor – IGF) [20].

Citrátový cyklus a onkometabolity

Mezi základní vlastnosti nádorových buněk patří intenzivní růst a proliferace. Tyto procesy vyžadují dostatečný přísun živin a také celkové přizpůsobení buněčného metabolismu. Nádorové buňky jsou metabolicky velmi aktivní a jejich metabolismus je anabolicky orientovaný. Často vykazují změny v aktivitě metabolických enzymů a hladinách ně-

kterých metabolitů jakožto produktů těchto enzymů. Relativně nedávno se podařilo popsat nádorově specifické mutované enzymy, které produkují tzv. onkometabolity. Jedná se o látky, které se ve zdravé buňce nevyskytují vůbec nebo jen v minimálním množství, ale díky aktivitě těchto enzymů se mohou hromadit v nádorech. Kvůli své podobnosti s přirozenými metabolity potom ovlivňují aktivitu dalších enzymů. Dlouhou dobu se mělo za to, že změny buněčného metabolismu jsou adaptací nádorových buněk a vedlejším důsledkem nádorové transformace. Dnes však víme, že produkty metabolických drah mohou významnou měrou přímo přispívat k procesu onkogeneze [21]. Zablokování aktivity příslušných enzymů tedy představuje další strategii pro cílenou terapii nádorových onemocnění.

Neznámějším onkometabolitem je 2-hydroxyglutarát (2-HG), produkt mutovaného enzymu isocitrátdehydrogenázy (IDH) [24,25]. IDH je jedním z enzymů CitC a existuje ve dvou variantách, rozlišujeme cytoplazmatický izoenzym IDH1 a mitochondriální IDH2. Onkometabolit 2-HG se může v buňce hromadit do vysokých koncentrací a působit jako inhibitor enzymů, které využívají jeho strukturní analog α -ketoglutarát (α -KG) jako substrát nebo kofaktor. Bylo zjištěno, že v důsledku produkce 2-HG dochází v nádorech k hypermethylaci genomu, která je způsobená kompetitivní inhibicí α -ketoglutarát-dependentních demethyláz [23,24]. Nadměrná metylace genomu je obecně jedním ze způsobů, jakým nádorové buňky překonávají aktivitu nádorových supresorů [26]. Mutace v genech *IDH1* a *IDH2* se objevují u řady nádorových onemocnění vč. gliomů nebo akutní myeloidní leukemie (AML) [27,28]. V souvislosti s leukemií byl prokázán vliv 2-HG na udržování nediferencovaného fenotypu krevních progenitorů [29]. Byly také publikovány studie, které poukazují na mutace *IDH1* a *IDH2* jako na vhodný prognostický marker [30]. Díky výše zmíněným účinkům 2-HG se IDH stala atraktivním cílem pro vývoj protinádorové terapie a v roce 2017 byl FDA schválen první inhibitor pro klinické použití. Jedná se o látku zvanou enasidenib, která je spe-

cifickým inhibítorem mitochondriální varianty enzymu IDH2. V klinických testech prokázal enasidenib pozitivní vliv na přežívání pacientů s AML, kteří byli nositeli mutace v genu *IDH2* [31].

Z přirozených metabolitů byl prokázán onkogenní potenciál sukcinátu a fumarátu, pokud se hromadí v nefyziologických koncentracích. Příčinou hromadění jsou mutace v enzymech CitC (sukcinátdehydrogenáza, fumaráthdratáza) využívajících tyto metabolity jako substrát. Podařilo se identifikovat dva mechanismy, kterými sukcinát a fumarát přispívají k nádorové transformaci. Ve vysokých koncentracích inhibují stejné α -ketoglutarát-dependentní demethylázy jako 2-HG a tím přispívají k hypermethylaci genomu [32]. Současně inhibují další enzymy zvané prolyl-hydroxylázy, které kontrolují aktivitu proonkogenu *HIF* [33]. Tento transkripční faktor zprostředkovává reakci buňky na hypoxické podmínky a jeho zvýšená aktivita může pomoci nádorové buňce přežít a dále prosperovat v organizmu [34]. Snížení hladiny sukcinátu a fumarátu v nádorové buňce by mohlo přinést podobný efekt jako v případě 2-HG a je proto zajímavé z terapeutického hlediska.

Zmíněné onkometabolity mají kromě nádorových onemocnění klinický význam i pro řadu metabolických onemocnění. Heterozygotní mutace v *IDH2* vedoucí k hromadění 2-HG byly popsány u závažného vrozeného onemocnění D-2-hydroxyglutarové acidurie [35]. Inaktivující mutace v genech *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* a *SDHD* kódujících sukcinátdehydrogenázu byly identifikovány v genomu pacientů trpících dědičným nádorovým syndromem zvaným Carney-Stratakis syndrom [36]. Je zajímavým zjištěním, že geny pro metabolické enzymy se mohou projevovat jako nádorové supresory.

Glutaminolýza

Díky intenzivnímu růstu odčerpávají nádorové buňky z CitC značné množství metabolitů, které slouží jako anabolické prekurzory pro syntézu biomakromolekul. Aby nedošlo k jejich úplnému vyčerpání a zablokování cyklu, dochází v některých nádorech k tzv. anapleróze, tedy kompenzaci chybějících

metabolitů z náhradního zdroje. Tímto zdrojem je obvykle glutamin. Proces využívání glutaminu pro anaplerotickou kompenzaci CitC se nazývá glutaminolýza a je jedním z dlouho studovaných cílů pro vývoj protinádorové terapie [37,38]. Glutamin je vhodným zdrojem, jelikož je nejvíce zastoupenou volnou aminokyselinou v krevním oběhu a je také významným zdrojem dusíku pro syntézu nukleotidů. Pro některé buněčné typy je využívání glutaminolýzy do jisté míry fyziologické [39]. Nádorové buňky však mohou být na glutaminu zcela závislé a některé nádorové buněčné linie, jako např. HeLa, nepřežívají bez přísunu glutaminu v jinak nutričně bohatém médiu a glutamin je proto důležitou složkou kultivačních médií.

V procesu glutaminolýzy je glutamin sérií enzymatických reakcí zbaven obou dusíkatých skupin a je přeměněn na α -KG, který vstupuje do CitC. Výkon této enzymatické kaskády je podobně jako u glykolýzy závislý na aktivitě příslušných enzymů. Využívání glutaminolýzy a navýšení kapacity těchto enzymů může být vyvoláno přímo potřebou kompenzovat CitC, ale může být také důsledkem nadměrné exprese proonkogenu *Myc*. Transkripční faktor *Myc* zvyšuje expresi enzymu glutaminázy (glutaminase – GLS) a glutaminového transportéru ASCT2 (alanine, serine, cysteine-preferring transporter 2) [40]. Jako vhodné cíle pro terapii se nabízí právě GLS, dále enzym glutamát dehydrogenáza (GLDH) a také glutaminové transportéry. Léčba by byla vhodná pro nádory s vysokou spotřebou glutaminu a vhodným markerem by mohla být míra exprese proteinu *Myc* [41]. Zejména u *Myc* pozitivních nádorů by zablokování produkce α -KG z glutaminu mohlo vést k efektivní terapeutické odpovědi.

Pokusy o vývoj terapie zacílené na glutaminolýzu se objevily na začátku druhé poloviny minulého století, přesto bohužel dodnes nevedly k vývoji použitelného léčiva. Výzkum se ubírá obdobným směrem jako v případě inhibice glykolýzy a testují se jak nemetabolizovatelné analogy glutaminu, tak inhibitory katabolických enzymů GLS a GLDH [42]. Mezi nejzajímavější látky patří tzv. BPTES

(Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide) a od něj odvozené analogy, které působí jako inhibitory GLS. Látka působí dobře na nádorové buněčné linie in vitro, pro použití v praxi však není dostatečně účinná a rozpustná ve vodném prostředí [43]. Další látka zvaná DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucin) patřila k prvním testovaným inhibitorům glutaminolýzy [44]. Tento glutaminový analog ale nebylo možné využít kvůli jeho vedlejším účinkům. V současné době se DON opět testuje a to v upravené formě, která se stává účinnou až po metabolizaci v některých tkáních [45]. Ve studiích se také objevují inhibitory aminokyselinových transportérů, jako je výše zmíněný ASCT2, který bývá ve zvýšené míře přítomen na membráně nádorových buněk [46].

Reaktivní kyslíkové radikály a oxidačně redukční rovnováha

Je dobře známo, že nádorové buňky produkují ve zvýšené míře reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species – ROS). Tímto souhrnným názvem označujeme skupinu vysoce reaktivních molekul zahrnující superoxid, singletový kyslík, hydroxylový radikál, peroxid vodíku a další. Nejvýznamnějším producentem ROS v buňce jsou mitochondrie a konkrétně ETC. Ke vzniku ROS dochází zejména tehdy, pokud přenos elektronů řetězcem neprobíhá optimálně a dochází k jejich úniku. ROS poškozují buněčné struktury vč. DNA a jsou známými mutageny. Kromě toho může vést větší množství ROS k aktivaci proonkogenních signálních drah. Tento vztah platí i naopak a onkoproteiny jako KRAS nebo *Myc* mohou stimulovat další produkci ROS [47]. Příliš vysoká hladina ROS je však pro buňku smrtící, a proto dochází v nádorech k přizpůsobení oxidačně redukční rovnováhy. Nádorová buňka produkuje větší množství ROS a současně je schopna kompenzovat jejich negativní dopady. Častým mechanismem je zvýšená aktivace transkripčního faktoru Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor-2), který je primárním zprostředkovatelem buněčné odpovědi na oxidační stres [48].

Zatímco velmi vysoká hladina ROS vede k nekrotické smrti buňky, o něco

nižší koncentrace jsou signálem pro spuštění apoptózy. V tomto kontextu je zajímavé, že klíčový antiapoptotický protein BCL-2 dokáže nejen potlačovat apoptózu, ale také regulovat hladinu ROS v buňkách. Tato regulační aktivita BCL-2 je nezávislá na antiapoptotické aktivitě proteinu (interakce s proteiny BAX a BAK) [49]. Z řady studií vyplývá, že protein BCL-2 snižuje hladinu ROS, pokud je příliš vysoká, ale za jiných okolností ji dokáže mírně navýšovat a tím přispívat k onkogenní signalizaci. Zatímco mírné prooxidační působení BCL-2 souvisí se stimulací OXPHOS, antioxidační působení je spíše sekundární reakcí buňky na zvýšenou expresi BCL-2. Vysoká exprese BCL-2 v buňkách koreluje se schopností odolávat oxidativnímu stresu. Stimulace exprese proteinu vede k navýšení hladiny některých klíčových antioxidačních molekul a svou roli hraje také klasická úloha proteinu, přímé potlačení apoptózy. Protein BCL-2 ale není přirozenou obranou proti oxidativnímu stresu a jeho antioxidační působení se proto uplatňuje zejména v nádorových buňkách s nefyziologicky zvýšenou expresí tohoto proteinu [50,51]. Inhibitory BCL-2, které by dokázaly potlačit jeho antioxidační účinek, by proto byly vhodným doplňkem léčby cytostatiky stimulačím produkci ROS.

Cílení na antioxidační mechanismy nádorové buňky představuje další strategii pro vývoj protinádorové terapie. Uplatňují se při ní dva odlišné přístupy, přičemž tím více využívaným je snaha o poškození nádorových buněk navýšením hladiny ROS. Předpokladem úspěchu tohoto přístupu je schopnost zdravých buněk lépe se vyrovnat s přechodně zvýšenou hladinou ROS. Méně studovanou možností je naopak inhibice produkce ROS, která by bránila nádorovým buňkám využívat jejich stabilně zvýšenou hladinu ve svůj prospěch. Některé zavedené metody léčby také uplatňují produkci ROS jako prostředek (nebo jeden z prostředků) k poškození nádorové buňky. Jedná se např. o radioterapii, která generuje ROS v ozářených buňkách nebo oxid arsenitý (ATO) jako jeden z příkladů zavedených cytostatik [52,53]. Mezi potenciální cíle terapie patří buněčné systémy, jejichž funkcí je obrana

proti oxidativnímu stresu. Expese řady proteinů zapojených do těchto systémů bývá v nádorech výrazně posílená, patří mezi ně např. superoxiddismutáza (SOD) a kataláza nebo thioredoxinový (SOD) a kataláza nebo thioredoxinový a glutathionový antioxidační systém. Další možnostmi jsou enzymy metabolismu jednonukleotidových zbytků SHMT2 (serine hydroxymethyltransferase 2) a MTHFD2 (metylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2), které napomáhají zásobování nádorových buněk redukčním kofaktorem NADPH nezbytným pro regeneraci glutathionu [47,52,53].

Množství inhibitorů těchto systémů se dostalo do fáze klinických testů, avšak testování zatím ani v jednom případě nebylo úspěšné a nevedlo k vývoji léčiva. Mezi látky, které se dostaly nejdál, patří např. inhibitor thioredoxin reduktáz motexafin gadolinium [54]. Další zajímavou látkou je β -lapachone, který v buňce produkuje superoxid po aktivaci oxidoreduktázou NQO1 (NAD(P)H quinone dehydrogenase 1) [55]. Inhibitor syntézy glutathionu L-buthionin-S-sulfoximin byl testován v kombinaci s cytostatikem melfalanem, jelikož zvýšená produkce glutathionu pravděpodobně přispívá k rezistenci buněk mnohočetného myelomu vůči tomuto léčivu [56]. Objevují se také pokusy o využití železa a tzv. Fentonovy reakce. Podstatou této reakce je katalytická přeměna peroxidu vodíku na hydroxylový radikál zprostředkovaná ionty železa. Díky produkci nejreaktivnější formy ROS je Fentonova reakce významným procesem, který hraje roli v některých patologických stavech, vč. kancerogeneze. Využití Fentonovy reakce by mohlo najít uplatnění v terapii nádorů, které mají nízkou úroveň exprese katalázy, která rozkládá molekuly peroxidu vodíku na vodu a kyslík. V buňkách těchto nádorů by mohlo vznikat významně větší množství hydroxylových radikálů než v buňkách zdravých [57].

Závěr

Snaha o cílení terapie nádorových onemocnění na mitochondriální procesy není novým fenoménem. Pokusy o potlačení metabolických procesů typicky spojených s nádory jsou starší než zna-

losti jejich významu pro nádorovou buňku. Jedná se zejména o glykolýzu a glutaminolýzu, což jsou dobře pozorovatelné procesy, jejichž souvislost s nádorovou fyziologií je známá již dlouho dobu. Naopak jiné přístupy, jako cílení na apoptotickou kaskádu a hromadění onkogenních metabolitů, jsou záležitostí poslední dekády nebo jen o málo starší. Přesto se právě tyto nové přístupy ukázaly jako perspektivní, když daly v posledních letech vzniknout dvěma úspěšně schváleným léčivům. Venetoklax, který patří mezi BH3 mimetika a blokuje antiapoptotickou aktivitu proteinu BCL-2 v nádorových buňkách je produktem cíleného výzkumu zaměřeného na konkrétní proces a molekulu v buňce. Stejným způsobem byl vyvinut i enasidenib, který blokuje enzym CitC isocitratdehydrogenázu a brání tak hromadění onkometabolitu 2-HG v nádorových buňkách. V případě strategie zaměřené na narušení oxidačně-redukční rovnováhy nádorových buněk sice existují léčiva, která se uplatňují tímto způsobem, avšak nejsou produktem výzkumu cíleného na tento konkrétní mechanismus. Výzkum se dále rozvíjí ve všech zmíněných oblastech, vč. těch, které doposud nebyly úspěšné. Můžeme doufat, že s rozvojem molekulární biologie se to brzy změní a dočkáme se dalších protinádorových léčiv cílených na mitochondriální procesy.

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(9): 621–632. doi: 10.1038/nrm2952.
3. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(1): 49–63. doi: 10.1038/nrm3722.
4. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Leverson JD et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(4): 273–284. doi: 10.1038/nrd.2016.253.
5. Deeks ED. Venetoclax: first global approval. *Drugs* 2016; 76(9): 979–987.
6. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927; 8(6): 519–530.
7. Hirschey MD, DeBerardinis RJ, Diehl AM et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 2015; 35 (Suppl): S129–S150. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.10.002.
8. Kaňková K, Hrstka R. Nádory jako metabolická onemocnění a diabetes jako riziko nádorů? *Klin Onkol*

- 2012; 25 (Suppl 2): 26–31. doi: 10.14735/amko20122526.
9. Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A et al. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1555(1–3): 14–20.
10. Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell* 2013; 24(2): 213–228. doi: 10.1016/j.ccr.2013.06.014.
11. Pelicano H, Martin DS, Xu RH et al. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25(34): 4633–4646. doi: 10.1038/sj.onc.1209597.
12. Chen Z, Zhang H, Lu W et al. Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787(5): 553–560. doi: 10.1016/j.bbcbio.2009.03.003.
13. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H et al. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170(1): 223–230.
14. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298(2): E141–E145. doi: 10.1152/ajpendo.00712.2009.
15. Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1835(2): 164–169. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.12.004.
16. Zhang D, Li J, Wang F et al. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett* 2014; 355(2): 176–183. doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.003.
17. El Mjiyyad N, Caro-Maldonado A, Ramírez-Peinado S et al. Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene* 2011; 30(3): 253–264. doi: 10.1038/onc.2010.466.
18. Gandini S, Puntoni M, Heckman-Stoddard BM et al. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014; 7(9): 867–885. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0424.
19. Luengo A, Sullivan LB, Heiden MG. Understanding the complex-lty of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. *BMC Biol* 2014; 12: 82. doi: 10.1186/s12915-014-0082-4.
20. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10(9): 671–684. doi: 10.1038/nrd3504.
21. Sciacovelli M, Frezza C. Oncometabolites: Unconventional triggers of oncogenic signalling cascades. *Free Radic Biol Med* 2016; 100: 175–181. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.025.
22. Ward PS, Patel J, Wise DR et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting α -ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010; 17(3): 225–234. doi: 10.1016/j.ccr.2010.01.020.
23. Dang L, White DW, Gross S et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462(7274): 739–744. doi: 10.1038/nature08617.
24. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian Y-M et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep* 2011; 12(5): 463–469. doi: 10.1038/embor.2011.43.
25. Xu W, Yang H, Liu Y et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011; 19(1): 17–30. doi: 10.1016/j.ccr.2010.12.014.
26. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010; 18(6): 553–567. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.015.
27. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ et al. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med* 2012; 18(4): 624–629. doi: 10.1038/nm.2682.
28. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD et al. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia* 2017; 31(2): 272–281. doi: 10.1038/leu.2016.275.
29. Wang F, Travins J, DeLaBarre B et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 2013; 340(6132): 622–626. doi: 10.1126/science.1234769.
30. Houdová Megová M, Drábek J, Dwigth Z et al. Mutace isocitrátdehydrogenázy jsou lepší prognostický marker než metylace promotoru O6-metylguanin-DNA-metyltransferázy u glioblastomů – retrospektivní molekulárně genetická studie gliomů z jednoho centra. *Klin Onkol* 2017; 30(5): 361–371. doi: 10.14735/amko2017361.
31. Nassereddine S, Lap CJ, Haroun F et al. The role of mutant IDH1 and IDH2 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2017; 96(12): 1983–1991. doi: 10.1007/s00277-017-3161-0.
32. Xiao M, Yang H, Xu W et al. Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev* 2012; 26(12): 1326–1338. doi: 10.1101/gad.191056.112.
33. Sullivan LB, Gui DY, Heiden MG. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(11): 680–693. doi: 10.1038/nrc.2016.85.
34. Schito L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression. *Trends Cancer* 2016; 2(12): 758–770. doi: 10.1016/j.trecan.2016.10.016.
35. Kranendijk M, Struys EA, Schaftingen E et al. IDH2 mutations in patients with d-2-hydroxyglutaric aciduria. *Science* 2010; 330(6002): 336–336. doi: 10.1126/science.1192632.
36. Schaefer I-M, Hornick JL, Bovée JV. The role of metabolic enzymes in mesenchymal tumors and tumor syndromes: genetics, pathology, and molecular mechanisms. *Lab Invest* 2018; 98(4): 414–426. doi: 10.1038/s41374-017-0003-6.
37. Fendt SM, Bell EL, Keibler MA et al. Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat Commun* 2013; 4: 2236. doi: 10.1038/ncomms3236.
38. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104(49): 19345–19350. doi: 10.1073/pnas.0709747104.
39. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 2010; 29(3): 313–324. doi: 10.1038/onc.2009.358.
40. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105(48): 18782–18787. doi: 10.1073/pnas.0810199105.
41. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P et al. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 2007; 178(1): 93–105. doi: 10.1083/jcb.200703099.
42. Jin L, Alesi GN, Kang S. Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene* 2016; 35(28): 3619–3625. doi: 10.1038/onc.2015.447.
43. Gross MI, Demo SD, Dennison JB et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(4): 890–901. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0870.
44. Ahluwalia GS, Grem JL, Hao Z et al. Metabolism and action of amino acid analog anti-cancer agents. *Pharmacol Ther* 1990; 46(2): 243–271.
45. Rais R, Jančařík A, Tenora L et al. Discovery of 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) prodrugs with enhanced CSF delivery in monkeys: a potential treatment for glioblastoma. *J Med Chem* 2016; 59(18): 8621–8633. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01069.
46. Schulte ML, Fu A, Zhao P et al. Pharmacological blockade of ASCT2-dependent glutamine transport leads to antitumor efficacy in preclinical models. *Nat Med* 2018; 24(2): 194–202. doi: 10.1038/nm.4464.
47. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer* 2014; 14(11): 709–721. doi: 10.1038/nrc3803.
48. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011; 475(7354): 106–109. doi: 10.1038/nature10189.
49. Low IC, Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid Redox Signaling* 2010; 13(6): 807–819. doi: 10.1089/ars.2009.3050.
50. Krishna S, Low IC, and Pervaiz S. Regulation of mitochondrial metabolism: yet another facet in the biology of the oncoprotein Bcl-2. *Biochem J* 2011; 435: 545–551. doi: 10.1042/BJ20101996.
51. Chong SJ, Low IC, Pervaiz S. Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator. *Mitochondrion* 2014; 19: 39–48. doi: 10.1016/j.mito.2014.06.002.
52. Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol* 2015; 11(1): 9–15. doi: 10.1038/nchembio.1712.
53. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem* 2017; 398(10): 1095–1108. doi: 10.1515/hsz-2017-0131.
54. Magda D, Miller RA. Motexafin gadolinium: A novel redox active drug for cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(6): 466–476. doi: 10.1016/j.semcancer.2006.09.002.
55. Bey EA, Bente MS, Reinicke KE et al. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(28): 11832–11837. doi: 10.1073/pnas.0702176104.
56. Tagde A, Singh H, Kang MH et al. The glutathione synthesis inhibitor buthionine sulfoximine synergistically enhanced melphalan activity against preclinical models of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2014; 4: e229. doi: 10.1038/bcj.2014.45.
57. Toyokuni S. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci* 2009; 100(1): 9–16. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.01001.x.

Ferroptóza jako nový typ buněčné smrti a její role v léčbě rakoviny

Ferroptosis as a New Type of Cell Death and its Role in Cancer Treatment

Skoupilová H., Michalová E., Hrstka R.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Ferroptóza je jedním z nově objevených typů buněčné smrti. Je geneticky, morfologicky i biochemicky odlišitelná od dalších typů programované buněčné smrti, jako je nekróza, apoptóza i autofagie. Pro indukci ferroptózy je důležitá hladina volného železa uvnitř buněk a tvorba reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS), které aktivují mechanismy vedoucí k buněčné smrti. K indukci ferroptózy může dojít prostřednictvím inhibice jednoho ze dvou klíčových procesů. Prvním je zablokování přenosu cystinu do buněk pomocí cystin/glutamátového transportního systému (X_c^-), neboť cystin slouží jako prekurzor k syntéze glutathionu, hlavního buněčného antioxidantu. Druhým je inhibice glutathion peroxidázy 4, která chrání buňky před peroxidací lipidů. Ferroptóza bývá asociovaná s mnoha metabolickými poruchami, vč. neurologických chorob nebo rakoviny. Molekuly zapojené do drah aktivujících ferroptózu se podílejí na obraně buněk před stresovými podmínkami, napomáhají udržovat hladinu nikotinamidadeninukleotidfosfátu, glutathionu a homeostázu železa. Důležitá je také spojitost s autofagií. Pomocí tzv. ferritinofagie dochází k uvolňování železa z lysozomů do cytosolu buněk. Následnou kaskádou reakcí uvolněných nestabilních atomů železa s jinými molekulami dochází k produkci ROS a iniciaci buněčného stresu, jež je spouštěčem ferroptózy. U onemocnění, jako je rakovina, při které jsou mechanismy indukující buněčnou smrt, vč. apoptózy potlačeny obvykle z důvodu genetických změn, může indukce alternativního způsobu buněčné smrti představovat atraktivní léčebnou strategii. **Závěr:** V posledních letech je výzkum nových protinádorových léků směřován na aktivaci alternativních drah buněčné smrti, které mohou překonat narušené metabolické procesy uvnitř rakovinných buněk nebo rezistenci buněk k běžně podávané chemoterapii. Byla nalezena celá řada molekul, které mohou ferroptózu v nádorových buňkách indukovat, což dodává jejímu výzkumu na významu, neboť by mohl vést k objevu nových alternativ při léčbě nádorových onemocnění.

Klíčová slova

buněčná smrt – rakovina – autofagie – ferroptóza – ferritinofagie – buněčný stres – ROS

Práce byla podpořena projekty GAČR 17-05838S, MŠMT – NPU I – LO1413 a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the projects GAČR 17-05838S, MEYS – NPS I – LO1413 and MH CZ-DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Hana Skoupilová
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: hana.skoupilova@mou.cz

Přijato/Accepted: 31. 8. 2018

doi: 10.14735/amko20182521

Summary

Background: Ferroptosis is a recently discovered type of cell death. It is genetically, morphologically, and biochemically distinct from other types of programmed cell death, such as necrosis, apoptosis, and autophagy. The level of intracellular free iron and reactive oxygen species formation are important for ferroptosis activation, which can occur through either of two key inhibitory processes. The first one involves inhibition of cystine transfer into cells by the cystine/glutamate antiporter system (X_c⁻). Cystine serves as a precursor for the synthesis of glutathione, a major cellular antioxidant. The second one involves the inhibition of glutathione peroxidase 4, which protects cells from lipid peroxidation. Ferroptosis is associated with many metabolic disorders, including neurological diseases and cancer. Molecules involved in the activation of ferroptotic pathways are involved in protecting cells against stress conditions, and in the maintenance of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and glutathione levels, as well as iron homeostasis. Also important is the connection with autophagy, so called ferritinophagy, in which iron is released from lysosomes into the cytosol. Cascade reactions of free unstable iron atoms with other molecules result in the production of reactive oxygen species that initiate the cellular stress that triggers ferroptosis. In diseases such as cancer where cell death inducing mechanisms, including apoptosis, are usually suppressed by genetic changes, the induction of alternative pathways leading to cell death could provide an attractive treatment strategy. **Conclusion:** In recent years, research into new antimetastatic drugs has focused on the activation of alternative cell death pathways that might overcome disturbed metabolic processes inside cancer cells or the chemotherapy resistance acquired in the course of routine treatment. A number of molecules have been found to induce ferroptosis in tumor cells, suggesting that they may offer new alternatives for anticancer treatment.

Key words

cell death – cancer – autophagy – ferroptosis – ferritinophagy – cellular stress – ROS

Úvod

Buněčná smrt je klíčovým fyziologickým mechanismem, na kterém je závislý vývoj organismu prakticky již od počátku embryogeneze, vč. plnohodnotné funkce imunitního systému nebo udržování správné funkce tkání a orgánů u dospělých mnohobuněčných organismů [1–5]. Původně se předpokládalo, že existují pouze 2 typy buněčné smrti, programovaná – apoptóza – nebo neprogramovaná – nekróza. Následkem vnějších faktorů, jako jsou zranění nebo infekce, buňka obvykle reaguje na nepříznivé podmínky nevratnými procesy a bývá likvidována prostřednictvím nekrózy. Spolu s nekrozou existují i další typy buněčné smrti, které jsou geneticky programované a bývají buňkou záměrně vyvolávány. Slouží převážně jako obranný mechanismus před poškozením buněk následkem patogenů, buněčného stresu nebo např. kumulací mutací v genech důležitých pro zásadní procesy uvnitř buňky [6]. Jedním z nejlépe prostudovaných typů programované buněčné smrti (programmed cell death – PCD) je apoptóza. Důsledkem apoptózy je např. diferenciace prstů v rozvíjejících se embryích [7]. Její deregulace může vést ke vzniku vrozených vývojových vad nebo k rozvoji rakoviny [8–11]. Během posledních desetiletí se však ukázalo, že apoptóza není zdaleka jediným typem PCD. Zkoumání jejích nových typů se stalo předmětem intenzivního výzkumu.

Mezi nově objevené typy PCD patří autofagie, nekroptóza, pyroptóza, pyronekróza a také ferroptóza [6,12–15].

Ferroptóza je relativně nově objeveným typem PCD, která je morfologicky, biochemicky i geneticky odlišitelná od dalších typů buněčné smrti. Morfologické odlišnosti byly prokázány transmisí elektronovou mikroskopií, která potvrdila, že ferroptotické buňky mají jasné substrukturní změny [14]. Pro buňky podléhající ferroptóze jsou charakteristické menší mitochondrie s nižší hustotou mitochondriálního obsahu a naopak zvýšeným mitochondriálním membránovým potenciálem [14,16]. Naopak klasické znaky objevující se u ostatních typů buněčné smrti, jako je kondenzace chromatinu u apoptózy nebo ruptury buněčné stěny u nekrózy, nebyly u ferroptotických buněk pozorovány [14]. Z biochemického hlediska dochází při ferroptóze k produkci cytosolických a lipidových reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS), jejichž tvorba ústí k vyčerpání antioxidantů v buňkách a následně buněčné smrti [14].

Historie objevu ferroptózy

Pojem ferroptóza byl poprvé zaveden v roce 2012 americkými vědci pod vedením profesora Brenta R. Stockwella [14] během výzkumu malých molekul erastinu, RSL3 a RSL5. Jedná se o sloučeniny selektivně letální pro nádorové

buňky nesoucí mutace v onkogenu RAS. Z tohoto důvodu byly pojmenovány jako RAS-selektivně letální molekuly (RSL) [17,18]. Jejich význam podtrhuje skutečnost, že geny rodiny malých GTPáz RAS (HRAS, NRAS a KRAS) jsou mutovány přibližně u 30 % všech nádorů [19], vč. nemalobuněčných nádorů plic [20], nádorů tlustého střeva [21], slinivky [22] nebo štítné žlázy [21,23]. Současně jsou pak tyto mutace u řady nádorů spojeny i se špatnou prognózou [23].

U nových RSL molekul však bylo třeba objasnit mechanismus účinku, neboť nebyly pozorovány klasické rysy apoptózy, jako je aktivace kaspáz, fragmentace chromatinu nebo uvolňování cytochromu c z mitochondrií [17,18,24]. Všechny tři sloučeniny naopak indukovaly RAS-RAF-MEK-závislou oxidativní buněčnou smrt [17,24]. Dále bylo zjištěno, že erastin spolu s RSL5 pro svoji funkci vyžadují přítomnost mitochondriálního anion-selektivního kanálu 3 (voltage-dependent anion channel – VDAC3), kdežto RSL3 funguje nezávisle na VDAC kanálech [24]. U všech tří molekul pak dochází k potlačení účinku po použití různých chelátorů železa. To úzce souvisí se skutečností, že mutanční Ras zvyšuje hladinu transferinových receptorů (TfR1) [24], které převádějí komplexy železa do cytoplazmy, kde následně dochází k jeho uvolnění (schéma 1) [25,26]. Stejně tak mutanční Ras snižuje množství ferritinu,

jehož molekula slouží ke skladování železa v buňkách [27]. Zesíleným transportem a současně snížením množství molekul, které udržují železo v navázaném stavu, pak dochází ke zvyšování volného železa v buňce [24]. Volné reaktivní železo Fe^{2+} uvolněné z endozomů nebo lysozomů je zapojeno do produkce ROS prostřednictvím Fentonovy reakce [28]. Smrt indukovaná prostřednictvím RSL je tedy spojena se zvýšením produkce ROS díky zabránění chelatace železa, popř. genetickou inhibicí hladiny železa v cytoplasmě [17,24]. I další proteiny zapojené v podobně působících drahách mohou rovněž aktivovat ferroptózu [17]. Dokonce bylo prokázáno, že jeden z nejdůležitějších nádorových supresorových proteinů, protein p53, často označovaný jako strážce genomu [29], může být zapojen do některých mechanismů iniciujících ferroptotickou buněčnou smrt [30].

Metabolismus železa při ferroptóze

Buněčné železo se zdá být jedním z nejdůležitějších faktorů při tvorbě lipidových peroxidových radikálů během ferroptózy [14,17]. Volné atomy železa Fe^{2+} se mohou za přítomnosti peroxidu vodíku pomoci tzv. Fentonovy reakce oxidovat na Fe^{3+} , z peroxidu je současně odebrán elektron a dochází k produkci hydroxylových radikálů přímo uvnitř buněk [31]. To vede k indukci buněčného stresu, poškození buňky volnými radikály a spuštění ferroptózy [14]. Z tohoto důvodu se buňky snaží chránit před vlivy volného železa hned několika způsoby. Jedním z nejdůležitějších proteinů, který plní v buňce tuto ochrannou funkci, je ferritin [32]. Jedná se o protein tvořený 24 podjednotkami lehkých a těžkých řetězců [32], přičemž těžké řetězce vykazují navíc ferroxidázovou aktivitu. Přijímané železo Fe^{2+} je pomocí těchto řetězců oxidováno na Fe^{3+} a skladováno uvnitř ferritinu v netoxických a biologicky dostupných formách [33]. Při zvýšené potřebě reaktivní formy železa je ferritin v lysozomech degradován a železo je uvolněno do cytosolu [34,35].

Transferin je dalším důležitým proteinem, který se uplatňuje především při transportu železa. Tento extracelulární

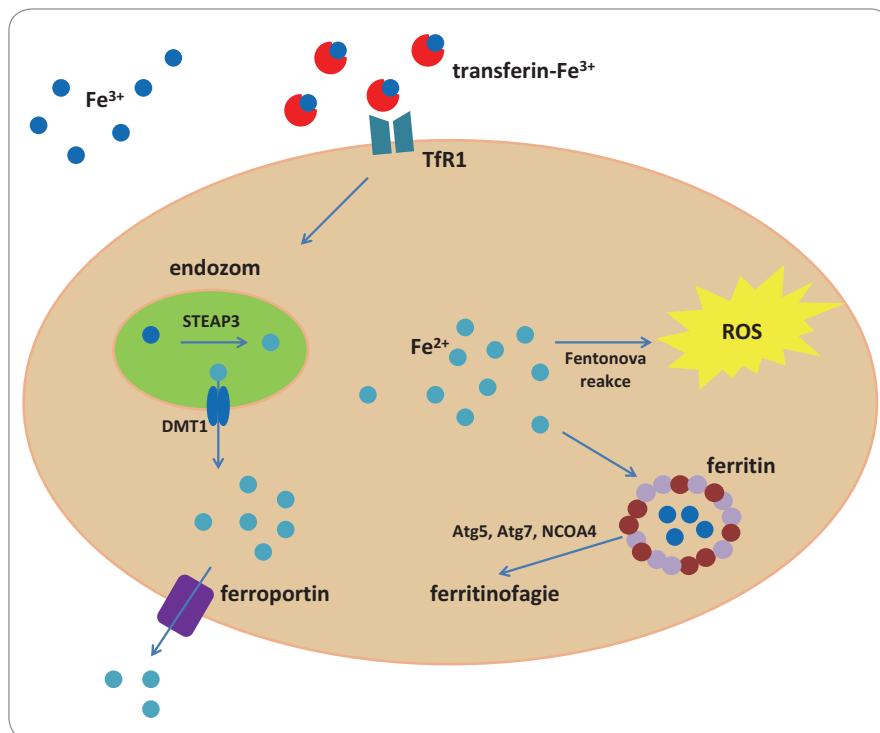


Schéma 1. Metabolismus železa při ferroptóze.

protein je schopen vázat 1–2 ionty železa Fe^{3+} , které přenáší krevním řečištěm, dokud není zachycen TfR1 lokalizovaným na povrchu buněk [25,36]. Komplex receptoru s navázaným transferrinem je posléze pohlcován endocytózou dovnitř buněk. Z endozomů jsou následně za účasti transmembránového transportéru DMT1 (divalent metal transporter-1), známého také jako Nramp2 (natural resistance-associated macrophage) uvolňovány do cytoplazmy nestabilní atomy železa Fe^{2+} spolu s volným transferrinem a TfR1, který je připraven k dalšímu transportu [36,37].

Pro udržování správné hladiny železa v buňce je kromě transportu dovnitř důležitý také transport železa ven z buňky. Jediným známým transportérem, který převádí železo ven přes buněčnou membránu do krve, je ferroporin 1. Je kódován genem *SLC40A1* [38]. Jeho správná regulace je rozhodující pro udržování optimální hladiny železa. Změny v hladině ferroporinu mohou vést k nedostatku, nebo naopak k nadbytku železa uvnitř buněk. Bylo prokázáno, že nedostatečná funkce ferroporinu může mít za následek ztrátu homeostázy a způsobit např. anémii u myši [39,40].

Mechanismus ferroptózy

Ferroptóza, tj. na intracelulárním železe závislá regulovaná forma buněčné smrti, může být indukována dvěma různými mechanismy. Prvním z nich je inhibice cystin/glutamátového transportního systému X_c^- (na sodíku nezávislém), který je vyžadován při transportu cystinu do buněk, kde dochází k syntéze glutathionu, hlavního buněčného antioxidantu. Narušením tohoto systému dochází k vyčerpání glutathionu a vzniku oxidativního stresu [41,42], což může být mimo jiné spouštěno i malými molekulami, tzv. induktory ferroptózy třídy I (FINs I) [42]. Druhým podnětem pro vznik ferroptotické buněčné smrti je inhibice glutathion peroxidázy 4 (GPX4), která používá glutathion k detoxikaci lipidových peroxidů [41,42]. GPX4 může být přímo inhibována tzv. induktory ferroptózy třídy II (FINs II) [42].

Cystin/glutamátový transportní systém X_c^-

V roce 1980 Bannai a Kitamura poprvé zdokumentovali X_c^- transportní systém v lidských embryonálních plicních fibroblastech [43]. O 2 roky později pak v podstatě totéž ukázali Makowske

Tab. 1. Nejznámější induktory ferroptózy.

Molekula	Označení	Cíl	Literatura
erastin	FIN I (ferroptózu indukující molekuly)	systém X_c^-	[15,18,19,25,32,52]
aldehyd erastin			[36]
piperazine erastin			[36]
DPI2			[36]
sulfasalazin (SAS)			[15,32,50,53,54]
sorafenib			[35,55,56]
RSL5			[18,52]
RSL3			[18 57]
1S, 3R – RSL3			[36]
DPI7 (ML162)			[36,52,57]
ML210	[52,57]		
DPI10	FIN II	GPX4	[36]
DPI12			[36]
DPI13			[36]
DPI17			[36]
DPI18			[36]
DPI19			[36]

a Christensen v transformovaných krysích buněčných liniích hepatomu [44]. Systém X_c^- působí jako obousměrný přenašeč aniontových forem cystinu a glutamátu a je závislý na Cl^- a nezávislý na Na^+ [45]. I když může transportovat obě aminokyseliny v obou směrech, jeho hlavním úkolem je zásobovat buňku cystinem a odvádět glutamát ven z buňky. Intracelulární zásoba cystinu je poměrně malá, zatímco koncentrace intracelulárního glutamátu je v buňce obecně vyšší než v extracelulárním prostoru, proto jsou molekuly přenášeny především po koncentračním spádu [46]. Extracelulární glutamát pak funguje jako kompetitivní inhibitor vychytávající cystin prostřednictvím transportního systému X_c^- [44]. Bylo prokázáno, že nejen radikály, ale i různá elektrofilní činidla [47], bakteriální lipopolysacharidy a zánětlivý cytokin (faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor – TNF α)) [48] nebo např. i pěstování buněčných kultur neutrofilů [49] nebo makrofágů [50] v podmínkách 21% hladiny kyslíku může systém X_c^- aktivovat. V roce 2012 Dixon et al prokázali souvislost mezi aktivací

ferroptózy a cystin/glutamátovým transportním systémem, a to díky výzkumu zaměřenému na studium mechanismu účinku ferrostatinu 1, který je selektivním inhibítozem ferroptózy indukované erastinem [14]. Současně byla objevena celá řada molekul, které jsou naopak schopny ferroptickou buněčnou smrt navodit (tab. 1).

Značný vliv na hladinu transportéru systému X_c^- může mít také protein p53. Bylo prokázáno, že p53 indukuje ferroptózu snížením exprese genu *SLC7A11*, který kóduje cystin/glutamátový transportní systém [51–53]. V důsledku toho dochází ke snížení příjmu cysteinu, vyčerpání hladiny antioxidantu glutathionu, což vede k neschopnosti buňky bojovat s oxidativním stresem [41,42].

Glutathion peroxidáza 4

Glutathion peroxidáza 4 (GPX4) je jednou z osmi glutathion peroxidáz známých u savců. S výjimkou GPX5, -7 a -8 (a GPX6 u hlodavců) obsahují všechny glutathion peroxidázy místo cysteinu selenocystein, který má jeden

atom síry nahrazen selenem [62]. Uvádí se, že selenocystein zde pravděpodobně zvyšuje účinnost v redoxních reakcích [63].

GPX4 funguje jako monomerní peroxidáza [64]. Kromě jednoduchých peroxidů a malých hydroperoxidů je schopná redukovat také hydroperoxy v komplexních lipidech, např. fosfolipidové, cholesterolové a cholesterolsterové hydroperoxy začleněné v biomembránách a lipoproteinech [64,65]. Vyčerpáním GPX4 tedy dochází ke snížení ochrany buněk před negativním účinkem reaktivních radikálů, hromadění lipidových peroxidů a k vyčerpání polynenasycených mastných kyselin v lipidových dvojvrstvách, což může vést k indukci ferroptózy [14,42,56,66–68].

Ferroptóza a její spojení s autofagií

Autofagie (z řečtiny „vlastní stravování“) je evolučně konzervovaný homeostatický mechanismus, který je zapojen do mnoha procesů udržujících správný chod buňky, jako je odstraňování špatně složených proteinů, poškozených organel a buněk napadených patogeny nebo také patologických stavů, vč. infekce nebo procesů souvisejících s rakovinou [69,70]. Nedávno bylo zjištěno, že aktivace autofagie je také jedním z důležitých induktorů ferroptózy v nádorových i normálních lidských buňkách [71–73]. Inhibitory autofagie jsou schopny ochránit buňky před vstupem do ferroptózy pravděpodobně prostřednictvím procesů zabráňujících tvorbě cytosolických a lipidových ROS [73]. K degradaci ferritinu jako zásobárny železa v buňkách dochází prostřednictvím lysozomů během autofagického procesu. V roce 2014 byl tento proces pojmenován jako ferritinofagie a současně s tím byl identifikován jaderný receptorový koaktivátor 4 (nuclear receptor coactivator 4 – NCOA4) přispívající k degradaci ferritinu během ferritinofagie [34]. Snížení aktivity receptoru NCOA4 stejně tak jako inhibice Atg5 a Atg7 omezuje degradaci ferritinu, snižuje hladinu reaktivního železa v cytosolu a potlačuje ferroptózu v normálních fibroblastech i nádorových buňkách [72]. Oproti tomu zvýšení hla-

diny NCOA4 urychluje ferroptózu, přičemž degradaci ferritinu dochází k uvolnění železa do cytosolu [72]. Tato zjištění naznačují, že selektivní autofagie může hrát významnou úlohu při zprostředkování ferroptózy [72].

Ferroptóza a nádorová onemocnění

Nádorová buňka nese ve své genetické výbavě celou škálu mutací narušujících základní obranné mechanismy. Mimo mutace v genech, jako jsou např. *TP53*, *RB1* nebo *RAS*, které dovolují buňce překonat kontrolní mechanismy zastávající buněčný cyklus či indukující buněčnou smrt, se nádorové buňky často setkávají také s nárůstem oxidativního stresu následkem změn v metabolických procesech a okolním mikroprostředí [74]. V reakci na zvýšenou hladinu ROS nádorová buňka indukuje zvýšení antioxidantní aktivity s cílem udržet redoxní homeostázu [75]. To přímo souvisí také s hladinami volného železa v cytoplazmě. Bylo prokázáno, že některé onkogeny, vč. *RAS* a *MYC*, mění metabolismus železa a jeho množství v buňkách tím, že ovlivňují expresi ferritinu nebo TfR1 [24,76–79].

Porozumění těmto procesům může mít velký vliv při hledání nových způsobů léčby rakoviny díky možnosti přesného zacílení na konkrétní části metabolických drah, které úzce souvisejí s redoxním stresem. Jednou z variant může být právě navození ferroptózy, která byla pozorována v ledvinových buňkách, neuronech a dále také v širokém spektru nádorových buněk, např. prsních, plicních, ovariálních, melanomů, gliomů a dokonce i u nádorů kostí [14,41,42,51–54,66,67,80–82].

Závěr

Ferroptóza jako jeden z nových typů programované buněčné smrti představuje proces, který je zcela závislý na množství reaktivního železa uvnitř cytoplazmy buněk. K aktivaci dochází narušením systémů, které v buňkách odbourávají ROS a lipidové peroxidy vznikající při chemických reakcích nebo nadměrném vystavení buněk oxidativnímu stresu. Na této skutečnosti je založen i současný výzkum, který se cíleně věnuje mož-

ností aktivovat alternativní dráhy buněčné smrti, vč. ferroptózy, s cílem obejít narušené metabolické procesy uvnitř nádorových buněk, se kterými je často spojena i rezistence ke standardně podávané terapii. Bylo prokázáno, že velké množství nádorových buněčných linií vykazuje citlivost k induktorům vyvolávajícím ferroptózu, proto i hledání nových sloučenin spouštějících ferroptózu představuje značně atraktivní alternativu, která může vést k objevu nových, účinnějších léků.

Literatura

- Akera T, Brody TM, Wiest SA. Saturable adenosine 5'-triphosphate-independent binding of [3H]-ouabain to brain and cardiac tissue in vitro. *Br J Pharmacol* 1979; 65(3): 403–409.
- Gunawardena AH. Programmed cell death and tissue remodelling in plants. *J Exp Bot* 2008; 59(3): 445–451. doi: 10.1093/jxb/erm189.
- Gaussand GM, Jia Q, van der Graaff E et al. Programmed cell death in the leaves of the arabidopsis spontaneous necrotic spots (sns-D) mutant correlates with increased expression of the eukaryotic translation initiation factor eIF4B2. *Front Plant Sci* 2011; 2: 9. doi: 10.3389/fpls.2011.00009.
- Daniail NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116(2): 205–219.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. Programmed cell death (apoptosis), in molecular biology of the cell. 4th edition. New York: Garland Science 2002.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19(1): 107–120. doi: 10.1038/cdd.2011.96.
- Wood W, Turmaine M, Weber R et al. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 2000; 127(24): 5245–5252.
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411(6835): 342–348. doi: 10.1038/35077213.
- Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 99–126. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456.
- Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(7): 501–507. doi: 10.1038/nrc2663.
- Ranger AM, Malynn BA, Korsmeyer SJ. Mouse models of cell death. *Nat Genet* 2001; 28(2): 113–118. doi: 10.1038/88815.
- Tait SW, Ichim G, Green DR. Die another way-nonapoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci* 2014; 127(Pt 10): 2135–2144. doi: 10.1242/jcs.093575.
- McKenzie BA, Mamik MK, Saito LB et al. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(26): E6065–E6074. doi: 10.1073/pnas.1722041115.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012; 149(5): 1060–1072. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(2): 135–147. doi: 10.1038/nrm3737.

- Kang R, Tang D. Autophagy and ferroptosis – what's the connection? *Curr Pathobiol Rep* 2017; 5(2): 153–159. doi: 10.1007/s40139-017-0139-5.
- Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol* 2008; 15(3): 234–245. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.02.010.
- Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 2003; 3(3): 285–296.
- Vigil D, Cherfils J, Rossman KL et al. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 2010; 10(12): 842–857. doi: 10.1038/nrc2960.
- Mitsuuchi Y, Testa JR. Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet* 2002; 115(3): 183–188. doi: 10.1002/ajmg.10692.
- Ofir Dovrat T, Sokol E, Frampton G et al. Unusually long-term responses to vemurafenib in BRAF V600E mutated colon and thyroid cancers followed by the development of rare RAS activating mutations. *Cancer Biol Ther* 2018; 1–4. doi: 10.1080/15384047.2018.1480289.
- Sekita-Hatakeyama Y, Nishikawa T, Takeuchi M et al. K-ras mutation analysis of residual liquid-based cytology specimens from endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration improves cell block diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* 2018; 13(3): e0193692. doi: 10.1371/journal.pone.0193692.
- Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL et al. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(17): 3226–3235. doi: 10.1200/JCO.2003.10.130.
- Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 2007; 447(7146): 864–868. doi: 10.1038/nature05859.
- Cheng Y, Zak O, Aisen P et al. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 2004; 116(4): 565–576.
- Chan RY, Ponka P, Schulman HM. Transferrin-receptor-independent but iron-dependent proliferation of variant Chinese hamster ovary cells. *Exp Cell Res* 1992; 202(2): 326–336.
- Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1275(3): 161–203.
- Terman A, Kurz T. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(8): 888–898. doi: 10.1089/ars.2012.4885.
- Guo G, Cui Y. New perspective on targeting the tumor suppressor p53 pathway in the tumor microenvironment to enhance the efficacy of immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2015; 3: 9. doi: 10.1186/s40425-015-0053-5.
- Wang SJ, Li D, Ou Y et al. Acetylation is crucial for p53-mediated Ferroptosis and tumor suppression. *Cell Rep* 2016; 17(2): 366–373. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.022.
- Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995; 82–83: 969–974.
- Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(10): 940–959.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004; 117(3): 285–297.
- Mancias JD, Wang X, Gygi SP et al. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature* 2014; 509(7498): 105–109. doi: 10.1038/nature13148.
- Asano T, Komatsu M, Yamaguchi-Iwai Y et al. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol Cell Biol* 2011; 31(10): 2040–2052. doi: 10.1128/MCB.01437-10.

36. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388(6641): 482–488. doi: 10.1038/41343.
37. Qian ZM, Li H, Sun H et al. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 2002; 54(4): 561–587.
38. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* 2005; 1(3): 191–200. doi: 10.1016/j.cmet.2005.01.003.
39. Zohn IE, De Domenico I, Pollock A et al. The fl-tiron mutation in mouse ferroportin acts as a dominant negative to cause ferroportin disease. *Blood* 2007; 109(10): 4174–4180. doi: 10.1182/blood-2007-01-066068.
40. Zhang Z, Zhang F, An P et al. Ferroportin1 deficiency in mouse macrophages impairs iron homeostasis and inflammatory responses. *Blood* 2011; 118(7): 1912–1922. doi: 10.1182/blood-2011-01-330324.
41. Dixon SJ, Patel DN, Welsch M et al. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *Elife* 2014; 3:e02523. doi: 10.7554/eLife.02523.
42. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 2014; 156(1–2): 317–331. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010.
43. Bannai S, Kitamura E. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 1980; 255(6): 2372–2376.
44. Makowske M, Christensen HN. Contrasts in transport systems for anionic amino acids in hepatocytes and a hepatoma cell line HTC. *J Biol Chem* 1982; 257(10): 5663–5670.
45. Patel SA, Warren BA, Rhoderick JF et al. Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system xc(-): an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. *Neuropharmacology* 2004; 46(2): 273–284.
46. Bannai S. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J Biol Chem* 1986; 261(5): 2256–2263.
47. Bannai S. Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents. *J Biol Chem* 1984; 259(4): 2435–2440.
48. Sato H, Fujiwara K, Sagara J et al. Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem J* 1995; 310 (Pt 2): 547–551.
49. Sakakura Y, Sato H, Shiiya A et al. Expression and function of cystine/glutamate transporter in neutrophils. *J Leukoc Biol* 2007; 81(4): 974–982. doi: 10.1189/jlb.0606385.
50. Watanabe H, Bannai S. Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1987; 165(3): 628–640.
51. Jiang L, Kon N, Li T et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature* 2015; 520(7545): 57–62. doi: 10.1038/nature14344.
52. Liu XX, Li XJ, Zhang B et al. MicroRNA-26b is under-expressed in human breast cancer and induces cell apoptosis by targeting SLC7A11. *FEBS Lett* 2011; 585(9): 1363–1367. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.018.
53. Robert SM, Buckingham SC, Campbell SL et al. SLC7A11 expression is associated with seizures and predicts poor survival in patients with malignant glioma. *Sci Transl Med* 2015; 7(289): 289ra286. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa8103.
54. Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N et al. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(47): 16836–16841. doi: 10.1073/pnas.1415518111.
55. Weiwer M, Bittker JA, Lewis TA et al. Development of small-molecule probes that selectively kill cells induced to express mutant RAS. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22(4): 1822–1826. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.09.047.
56. Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73(11–12): 2195–2209. doi: 10.1007/s00018-016-2194-1.
57. Gout PW, Buckley AR, Simms CR et al. Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)-cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia* 2001; 15(10): 1633–1640.
58. Eling N, Reuter L, Hazin J et al. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience* 2015; 2(5): 517–532. doi: 10.18632/oncoscience.160.
59. Lachaier E, Louandre C, Godin C et al. Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. *Anticancer Res* 2014; 34(11): 6417–6422.
60. Louandre C, Ezzoukry Z, Godin C et al. Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. *Int J Cancer* 2013; 133(7): 1732–1742. doi: 10.1002/ijc.28159.
61. Viswanathan VS, Ryan MJ, Dhruv HD et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 2017; 547(7664): 453–457. doi: 10.1038/nature23007.
62. Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(5): 3289–3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
63. Conrad M, Friedmann Angeli JP. Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and ferroptosis: what's so special about it? *Mol Cell Oncol* 2015; 2(3): e995047. doi: 10.4161/23723556.2014.995047.
64. Takebe G, Yarimizu J, Saito Y et al. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem* 2002; 277(43): 41254–41258. doi: 10.1074/jbc.M202773200.
65. Thomas JP, Geiger PG, Maiorino M et al. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1045(3): 252–260.
66. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol* 2014; 16(12): 1180–1191. doi: 10.1038/ncb3064.
67. Skouta R, Dixon SJ, Wang J et al. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *J Am Chem Soc* 2014; 136(12): 4551–4556. doi: 10.1021/ja411006a.
68. Magtanong L, Ko PJ, Dixon SJ. Emerging roles for lipids in non-apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 2016; 23(7): 1099–1109. doi: 10.1038/cdd.2016.25.
69. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1): 27–42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
70. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; 147(4): 728–741. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
71. Gao M, Monian P, Pan Q et al. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res* 2016; 26(9): 1021–1032. doi: 10.1038/cr.2016.95.
72. Hou W, Xie Y, Song X et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy* 2016; 12(8): 1425–1428. doi: 10.1080/15548627.2016.1187366.
73. Torii S, Shintoku R, Kubota C et al. An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells. *Biochem J* 2016; 473(6): 769–777. doi: 10.1042/BJ20150658.
74. Cross CE, Halliwell B, Borish ET et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107(4): 526–545.
75. Chio IIC, Tuveson DA. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol Med* 2017; 23(5): 411–429. doi: 10.1016/j.molmed.2017.03.004.
76. Kakhlon O, Gruenbaum Y, Cabantchik ZI. Ferritin expression modulates cell cycle dynamics and cell responsiveness to H-ras-induced growth via expansion of the labile iron pool. *Biochem J* 2002; 363(Pt 3): 431–436.
77. Kakhlon O, Gruenbaum Y, Cabantchik ZI. Repression of ferritin expression modulates cell responsiveness to H-ras-induced growth. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(4): 777–780. doi: 10.1042.
78. O'Donnell KA, Yu D, Zeller KI et al. Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2006; 26(6): 2373–2386. doi: 10.1128/MCB.26.6.2373-2386.2006.
79. Wu KJ, Polack A, Dalla-Favera R. Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* 1999; 283(5402): 676–679.
80. Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* 2017; 551(7679): 247–250. doi: 10.1038/nature24297.
81. Drayton RM, Dudziec E, Peter S et al. Reduced expression of miRNA-27a modulates cisplatin resistance in bladder cancer by targeting the cystine/glutamate exchanger SLC7A11. *Clin Cancer Res* 2014; 20(7): 1990–2000. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2805.
82. Miess H, Dankworth B, Gouw AM et al. The glutathione redox system is essential to prevent ferroptosis caused by impaired lipid metabolism in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. In press 2018. doi: 10.1038/s41388-018-0315-z.

Možnosti využití p63 v bioptické diagnostice

Possible Usage of p63 in Bioptic Diagnostics

Galoczová M., Nenutil R., Coates P.J., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Transkripční faktor p63 je homologem p53, nicméně jeho role ve vývoji a onkogenezi není tak jednoznačná. Gen *TP63* kóduje množství N- a C-koncových izoform proteinu, jejichž exprese a funkce se navzájem liší. Nejlépe prostudované jsou N-koncové varianty Δ Np63 (p40) a TAp63. p40 je charakteristickým markerem bazálních nebo myoepiteliálních buněk víceřadých epitelů a podílí se na regulaci proliferace a diferenciaci. TAp63 izoforma je více exprimována v buňkách suprabazální vrstvy a kromě epitelů také v primárních oocytech, lymfocytech a stromálních buňkách, je schopná indukovat apoptózu a hraje roli v udržování genomové integrity. Role jednotlivých izoform se liší také v nádorové progresi, kdy p40 je obecně považována za onkoprotein zapojený do regulace nádorových kmenových buněk, zatímco exprese TAp63 je spojována s lepší prognózou onemocnění. **Cíl:** Jaderná exprese p63 je markerem používaným v klinické patologii k diagnostice různých typů malignit, nejčastěji dlaždicobuněčného karcinomu plic či karcinomů urogenitálního traktu, svou roli hraje také ve vyšetření bioptických vzorků karcinomu prsu (breast carcinoma – BC) a prostaty (prostate carcinoma – PC). U neoplastických buněk lze však při použití protilátky 4A4 pozorovat expresi p63 také v cytoplazmě či v extracelulárním materiálu. Tento přehledový článek stručně shrnuje možnosti a nástrahy použití p63 v bioptické diagnostice, zejména u BC a PC, poukazuje také na potenciál využití specifických protilátek proti izoformám p40 a TAp63. Zabývá se rovněž dalším klinickým využitím p63 v histogenetické klasifikaci nádorů.

Klíčová slova

p63 – Δ Np63 (p40) – TAp63 – karcinom prsu – karcinom prostaty

Summary

Background: The p63 transcription factor is a p53 homologue; however, its role in development and oncogenesis is more unambiguous than that of p53. TP63 encodes a variety of N- and C-terminal isoforms with different expression patterns and functions. The most frequently studied are N-terminal variants Δ Np63 (p40) and TAp63. p40 is a characteristic basal or myoepithelial cell marker of stratified epithelium and it partakes in the regulation of proliferation and differentiation. The TAp63 isoform is more expressed in the suprabasal cell layer but is also expressed in primary oocytes, lymphocytes and stromal cells. It induces apoptosis and plays a role in the maintenance of genome integrity. The role of each isoform differs also in tumor progression. p40 is generally considered to behave as an oncoprotein in the regulation of cancer stem cells, while TAp63 expression is associated with a better prognosis. **Aim:** Nuclear expression of p63 is a widely used as a diagnostic marker in the clinical pathology of a spectrum of malignancies, mostly lung squamous cell carcinomas and urogenital tract carcinomas; however, it also used during examination of breast (BC) and prostate carcinoma bioptic samples. However, cytoplasmic or extracellular p63 expression is observed in neoplastic cells when the 4A4 antibody is used. This mini-review briefly summarizes the possibilities and pitfalls of p63 usage, particularly when it is used in bioptic diagnostics of BC and prostate carcinoma and highlights the potential applications of isoform specific p40 and TAp63 antibodies. It also describes other clinical usages of p63, for instance in the histogenetical classification of tumors.

Key words

p63 – Δ Np63 (p40) – TAp63 – breast carcinoma – prostate carcinoma

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Michaela Galoczová
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: michaela.galoczova@mou.cz

Přijato/Accepted: 17. 8. 2018

doi: 10.14735/amko20182527

Úvod

Protein p63 patří do rodiny transkripčního faktoru a nádorového supresoru p53, kam se kromě p53 řadí také p73. Tyto proteiny navzájem vykazují vysokou sekvenční homologii a sdílejí stejnou doménovou strukturu, což jim umožňuje navzájem interagovat či vázat se na transkripční cíle ostatních členů rodiny. Role jednotlivých proteinů se ve vývoji tkání a onkogenezi liší, odlišná je dokonce i funkce jednotlivých izoform. Gen *TP63* kóduje nejméně 10 různých izoform p63. Transkripce ze dvou různých promotorů umožňuje vznik dvou N-koncových izoform, plnodělkové TAp63 a N-koncově zkrácené ΔNp63 izoformy, která bývá rovněž označována jako p40 a postrádá N-koncovou transkripčně aktivační doménu. Alternativním sestřihem pak vznikají C-koncové varianty (α, β, γ, δ, ε) [1,2]. Převládající izoformou v tkáních je p40, která je exprimovaná ve vysoké míře v bazálních a myoepiteliálních buňkách vrstevnatého dlaždicového a žláznatého epitelu různých orgánů [3] a je také známa pro svou roli v udržování proliferativního potenciálu epiteliálních kmenových buněk [4,5]. S mírou buněčné diferenciace exprese p40 klesá. TAp63 se naopak vyskytuje v bazálních epiteliálních buňkách pouze zřídka, vyšší expresi lze pak pozorovat v buňkách umístěných suprabazálně, což naznačuje odlišnou

roli obou izoform v průběhu diferenciace [6]. Exprese TAp63 je také charakteristická pro jádra primárních oocytů [7], byla detekována v lymfocytech a stromálních buňkách [8]. Nedávno byla popsána nová izoforma GTAp63 vyskytující se u prekursorů samčích zárodečných buněk, kde přispívá k udržování integrity genomu [9]. Z hlediska onkogeneze je TAp63 obecně považována za nádorový supresor díky schopnosti indukovat zástavu buněčného cyklu a apoptózu [10], zatímco p40 vykazuje vlastnosti onkoproteinu a její vysoká exprese je charakteristická zejména pro dlaždicobuněčné karcinomy [11], uroteliální karcinomy [12] a karcinomy bazálního typu [13–15]. O p40 se také diskutuje jako o markeru nádorových kmenových buněk u různých typů nádorových onemocnění [16]. Nicméně TAp63 se rovněž může chovat jako onkoprotein a bylo prokázáno, že je převládající izoformou u některých typů hematologických malignit [17] (tab. 1). O jednotlivých C-koncových izoformách p63 se ví zatím pouze málo, což je také způsobeno komerční nedostupností specifických protilátek (s výjimkou p63α a γ), současné studie však naznačují jejich rozdílné funkce [18,19]. V bioptické diagnostice se využívá průkaz p63, event. cíleně průkaz p40 dvěma základními způsoby. V první řadě se jedná o znázornění myoepitelií nebo bazálních

buněk s cílem zhodnotit invazivitu, nebo obecněji malignitu léze. Dalším použitím je průkaz p40 jako markeru diferenciace nádoru směrem k víceřadému epitelu nebo k jeho histogenetickému zařazení.

Průkaz myoepitelií nebo bazálních buněk

U normální tkáně mléčné žlázy je jaderná exprese p63 charakteristickým markerem myoepiteliálních buněk, zatímco luminální buňky jsou p63 negativní. Použití p63 v nádorové patologii odstartovala celá řada studií zaměřených na duktální karcinom *in situ* (DCIS), které navrhly použití přítomnosti myoepiteliálních buněk k odlišení invazivních a neinvazivních lézí [20,21]. Myoepiteliální buňky tvoří v nenádorové mléčné žláze souvislou vrstvu lemující epiteliální stranu bazální membrány. U karcinomů *in situ* jsou myoepiteliální buňky zachovány, příp. mírně redukovány v hustotě. Kompletní absence myoepitelií pak svědčí pro invazivní charakter léze [20].

Podrobnější studie zaměřené na charakteristiky myoepiteliálních buněk v *in situ* karcinomech duktálního, ale rovněž lobulárního (lobular carcinoma *in situ* – LCIS) a papilárního typu nebo intraduktálních papilomů prokazují alteraci imunofenotypu ve smyslu snížené exprese některých markerů, p63 však má

Tab. 1. Exprese a funkce jednotlivých N-koncových variant p63 u normální a nádorové tkáně.

	Normální tkáň		Nádorová tkáň	
	Vysoká exprese	Funkce	Vysoká exprese	Funkce
ΔNp63	myoepiteliální buňky bazální buňky	udržování proliferativního potenciálu epiteliálních kmenových buněk	dlaždicobuněčné karcinomy uroteliální karcinomy karcinomy bazálního typu	role v progresi nádorového onemocnění regulace vlastností nádorových kmenových buněk
TAp63	suprabazální buňky primární oocyty B lymfocyty	regulace proliferace a diferenciace epiteliálních buněk udržování integrity genomu	hematologické malignity	role v progresi nádorového onemocnění
GTAp63	stromální buňky prekurzory samčích zárodečných buněk	udržování integrity genomu		

relativně nejvyšší citlivost [22–24]. Vzhledem k dále diskutovaným skutečnostem o jeho expresi v invazivních nádorech je však jeho specifická částečně omezena a ve sporných případech se doporučuje vždy použití dvou markerů, zejména doplnění průkazu p63 o barvení kalponinu [24,25]. Dalšími používanými markery myoepiteliálních buněk jsou CD10, myozin těžkého řetězce hladkého svalstva (smooth muscle myosin heavy chain – SMMHC) či cytokeratiny 5/6, a to často spolu s p63 jako součástí různých protilátkových koktejlů [25–27]. U vzácných epiteliálně-myoepiteliálních karcinomů prsu (breast carcinoma – BC), jako jsou myoepiteliální karcinomy [28] či adenoidně cystické karcinomy [29], však myoepiteliální p63 pozitivní buňky tvoří součást nádoru.

Nicméně ne všechny neoplastické buňky běžných karcinomů jsou p63 negativní. Mimo jadernou lokalizaci bylo imunohistochemické barvení p63 u řady invazivních BC pozorováno také v cytoplazmě neoplastických buněk, ovšem pouze ve studiích využívajících nejčastěji používanou anti-p63 protilátku klon 4A4 [13,30–32]. Ve srovnání s 4A4 je pak p40 protilátka s výhradně jaderným barvením považována za více specifickou [33]. Jelikož ale bývá cytoplazmatická exprese p63 v literatuře často zmiňována, bude jí věnován prostor také v této publikaci.

Mezi nádory charakteristické vysokou jadernou expresí p63 patří zejména karcinomy bazálního typu 2 (basal like 2 – BL2) patřící do skupiny triple negativních BC (TNBC), které jsou negativní pro estrogenový (ER), progesteronový (PR) receptor a také receptor typu 2 pro lidský epidermální růstový faktor (human epidermal growth factor receptor 2 – HER2) [34]. U TNBC bazálního typu byla pozorována rovněž vyšší exprese p63 v cytoplazmě ve srovnání s nebazálními typy [13]. Jadernou expresí p63 lze nalézt také u malého procenta ER+ karcinomů [35,36].

Z pohledu histologické klasifikace BC byla jaderná exprese p63 navržena jako specifický marker metaplastických karcinomů [37]. Nicméně p63 pozitivní je také relativně vysoké procento medulárních a atypických medulárních karcinomů [38]. V literatuře lze nalézt rovněž

případy p63 pozitivních maligních fyloidních či sarkomatoidních nádorů [39]. Jaderná i cytoplazmatická exprese byla pozorována u některých invazivních mikropapilárních [40] a také u sekrečních karcinomů, kde byl p63 pozitivní také intraluminální sekretovaný materiál [31,41]. Příkladem karcinomu s atypickou expresí p63 je s těhotenstvím spojený BC. Myoepiteliální buňky u tohoto onemocnění vykazují sníženou jadernou expresí p63, zatímco asociované epiteliální buňky jsou pozitivní pro cytoplazmatickou expresi tohoto proteinu. Aberantní cytoplazmatická exprese p63 zde zřejmě přispívá k zvýšení invazivity a agresivity epiteliálních buněk [30,32].

Při použití 4A4 protilátky je zapotřebí počítat se skutečností, že rozpoznává všechny izoformy p63 a navíc vykazuje křížovou reaktivitu s p73 [8]. Specifická cytoplazmatického barvení touto protilátkou je také předmětem diskuzí. Vzhledem k odlišným funkcím jednotlivých izoform p63 a p73 v nádorové progresi se jeví použití izoformově specifických monoklonálních protilátek jako lepší diagnostický nástroj. Studie hodnotící specifitu a citivost p40 jako markeru myoepiteliálních buněk ve srovnání s 4A4 ukazují, že použití obou protilátek je srovnatelné [42–44]. Nicméně např. u TNBC použití protilátek specifických proti jednotlivým variantám p63 ukázalo, že zatímco exprese p40 asociuje s metaplastickými a medulárními karcinomy a s bazálním buněčným fenotypem, exprese TAp63 koreluje s expresí androgenového receptoru (AR), nemutovaným BRCA1/2 statusem a pozitivitou PTEN. TAp63 pozitivní nádory navíc vykazují lepší celkové přežití [45].

Jaderná exprese p63 je v klinické praxi používána také jako marker bazálních buněk prostaty. Bazální buňky prostaty podobně jako myoepiteliální buňky prsu tvoří souvislou vrstvu podél bazální membrány pod vrstvou luminálních buněk. V prostatě se navíc vyskytuje ještě jeden buněčný typ, buňky neuroendokrinní, které jsou spolu s luminálními buňkami p63 negativní [46,47]. p63 pozitivní bazální buňky lze nalézt u benigní prostatické hyperplazie (BPH), u prekancerózní prostatické in-

traepiteliální neoplazie (PIN) a v adenóze prostaty. Většina karcinomů prostaty (prostate carcinoma – PC) je ovšem p63 negativní [48]. Proto je také negativita p63 používána k odlišení dobře diferencovaných invazivních karcinomů v punkčních biopsiích, nejčastěji v rámci protilátkového koktejlů spolu s alfa-metylacyl racemázou (AMACR) a cytokeratiny o vysoké molekulové hmotnosti (high molecular weight cytokeratins – CK HMW, 34βe12) [49]. V literatuře lze však najít i kazuistiky p63 pozitivních invazivních PC. Existují vzácné případy PC z bazálních buněk [14,15] a také případy p63 pozitivních adenokarcinomů, které jsou molekulárně odlišné od PC obvyklého typu a také od karcinomů z bazálních buněk a vykazují expresi bazálních i luminálních markerů. Tyto nádory jsou pozitivní při použití 4A4 a většina z nich také při použití p40 protilátky [50,51]. Stejně jako u BC byly u PC rovněž zaznamenány případy cytoplazmatické exprese p63 u neoplastických buněk, exprese tohoto markeru navíc korelovala se zvýšenou mortalitou [52].

Histogenetická klasifikace nádorů

V řadě nádorových lokalit může být průkaz diferenciaci karcinomu směrem k víceřadému epitelu klinicky důležitý. Výrazným příkladem je klasifikace nemalobuněčných plicních karcinomů v malých, morfologicky často málo reprezentativních punkčních biopsiích. Pozitivita p40 je zde spolu s negativitou tyroidního transkripčního faktoru 1 (TTF1) a Napsinu A typickým znakem dlaždicobuněčných karcinomů a vylučuje adenokarcinom [53]. Použití p40 specifických protilátek zde značně zlepšuje specifitu diagnózy [54]. V situaci, kdy je k dispozici omezené množství materiálu, je tak možno optimalizovat sekvenci navazujících prediktivních vyšetření, jako jsou mutace receptoru pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor – EGFR) a translokace genu anaplastické lymfomové kinázy (ALK) u adenokarcinomu či exprese ligandu receptoru programované buněčné smrti 1 (programmed death-ligand 1 – PD-L1) u spinocelulárního karcinomu. Obecné rozlišení mezi adenokarcinomem a spinocelulárním

nebo uroteliálním karcinomem pomocí barvení p40 je také užitečné zejména při vyšetření morfologicky nezařaditelných nádorů urogenitálního traktu [55]. V patologii slinných žláz se barvení p63 používá k rozlišení acinárního (negativní) a mukoepidermoidního (pozitivní) karcinomu slinných žláz [56]. Rozdíly v expresi p63 mezi intermediárním trofoblastem choriových klků a implantačním trofoblastem mohou být dále využity v diferenciální diagnostice vzácnějších trofoblastických nádorů a případně dalších trofoblastických lézí [57].

Závěr

Imunohistochemické barvení p63, zejména izoformy Δ Np63 (p40), je v současné době dobře zavedenou metodou bioptické diagnostiky sloužící zejména k průkazu invazivity negativních nádorových lézí v orgánech s víceřadým epitelem (prs, prostata) a k upřesnění histogenetické klasifikace karcinomů (plíce, urogenitální trakt). Potenciál průkazu p63, příp. jeho specifických izoform v souvislosti s možnou úlohou v biologii nádorových kmenových buněk nebo jako prediktivního markeru na své možné naplnění teprve čeká.

Literatura

1. Yang A, Kaghad M, Wang Y et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2(3): 305–316.
2. Mangiulli M, Valletti A, Caratuzzolo MF et al. Identification and functional characterization of two new transcriptional variants of the human p63 gene. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(18): 6092–6104. doi: 10.1093/nar/gkp674.
3. Kurita T, Cunha GR, Robboy SJ et al. Differential expression of p63 isoforms in female reproductive organs. *Mech Dev* 2005; 122(9): 1043–1055. doi: 10.1016/j.mod.2005.04.008.
4. Chakrabarti R, Wei Y, Hwang J et al. Δ Np63 promotes stem cell activity in mammary gland development and basal-like breast cancer by enhancing Fzd7 expression and Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 2014; 16(10): 1004–1015, 1001–1013. doi: 10.1038/ncb3040.
5. Pignoni JC, Grisanzio C, Geng Y et al. p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(20): 8105–8110. doi: 10.1073/pnas.1221216110.
6. Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol* 2002; 198(4): 417–427. doi: 10.1002/path.1231.
7. Suh EK, Yang A, Kettenbach A et al. p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature* 2006; 444(7119): 624–628. doi: 10.1038/nature05337.
8. Nekulova M, Holcakova J, Nenutil R et al. Characterization of specific p63 and p63-N-terminal isoform antibodies and their application for immunohistochemistry. *Virchows Arch* 2013; 463(3): 415–425. doi: 10.1007/s00428-013-1459-4.
9. Beyer U, Moll-Roccek J, Moll UM et al. Endogenous retrovirus drives hitherto unknown proapoptotic p63 isoforms in the male germ line of humans and great apes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(9): 3624–3629. doi: 10.1073/pnas.1016201108.
10. Guo X, Keyes WM, Papazoglu C et al. TA-p63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nat Cell Biol* 2009; 11(12): 1451–1457. doi: 10.1038/ncb1988.
11. Hu H, Xia SH, Li AD et al. Elevated expression of p63 protein in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 102(6): 580–583. doi: 10.1002/ijc.10739.
12. Ud Din N, Qureshi A, Mansoor S. Utility of p63 immunohistochemical stain in differentiating urothelial carcinomas from adenocarcinomas of prostate. *Indian J Pathol Microbiol* 2011; 54(1): 59–62. doi: 10.4103/0377-4929.77326.
13. Kamarlis RK, Lubis MN, Hernowo BS et al. Immunoneexpression of P63 and SOX2 in triple-negative breast cancers, Indonesia. *F1000Res* 2017; 6: 1780. doi: 10.12688/f1000research.12671.2.
14. Chang K, Dai B, Kong Y et al. Basal cell carcinoma of the prostate: clinicopathologic analysis of three cases and a review of the literature. *World J Surg Oncol* 2013; 11(1): 193. doi: 10.1186/1477-7819-11-193.
15. Ali TZ, Epstein JI. Basal cell carcinoma of the prostate: a clinicopathologic study of 29 cases. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(5): 697–705. doi: 10.1097/01.pas.0000213395.42075.86.
16. Nekulova M, Holcakova J, Coates P et al. The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. *Cell Mol Biol Lett* 2011; 16(2): 296–327. doi: 10.2478/s11658-011-0009-9.
17. Alexandrova EM, Moll UM. Role of p53 family members p73 and p63 in human hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2012; 53(11): 2116–2129. doi: 10.3109/10428194.2012.684348.
18. Boldrup L, Coates PJ, Gu X et al. DeltaNp63 isoforms differentially regulate gene expression in squamous cell carcinoma: identification of Cox-2 as a novel p63 target. *J Pathol* 2009; 218(4): 428–436. doi: 10.1002/path.2560.
19. Li N, Li H, Cherukuri P et al. TA-p63-gamma regulates expression of DeltaN-p63 in a manner that is sensitive to p53. *Oncogene* 2006; 25(16): 2349–2359. doi: 10.1038/sj.onc.1209270.
20. Wang X, Mori I, Tang W et al. p63 expression in normal, hyperplastic and malignant breast tissues. *Breast Cancer* 2002; 9(3): 216–219.
21. Werling RW, Hwang H, Yaziji H et al. Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(1): 82–90.
22. Hill CB, Yeh IT. Myoepithelial cell staining patterns of papillary breast lesions: from intraductal papillomas to invasive papillary carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2005; 123(1): 36–44.
23. Wang Y, Jindal S, Martel M et al. Myoepithelial cells in lobular carcinoma in situ: distribution and immunophenotype. *Hum Pathol* 2016; 55: 126–134. doi: 10.1016/j.humpath.2016.05.003.
24. Rohilla M, Bal A, Singh G et al. Phenotypic and functional characterization of ductal carcinoma in situ-associated myoepithelial cells. *Clin Breast Cancer* 2015; 15(5): 335–342. doi: 10.1016/j.clbc.2015.01.004.
25. med.stanford.edu. [online]. Ductal carcinoma in situ of the breast. Available from: <http://surgpapathcriteria.stanford.edu/breast/dcis/differentialdiagnosis.html>.
26. Reisenbichler ES, Ross JR, Hameed O. The clinical use of a P63/cytokeratin7/18/cytokeratin5/14 antibody cocktail in diagnostic breast pathology. *Ann Diagn Pathol* 2014; 18(6): 313–318. doi: 10.1016/j.anndiagnpath.2014.08.007.
27. Pavlakis K, Zoubouli C, Liakakos T et al. Myoepithelial cell cocktail (p63+SMA) for the evaluation of sclerosing breast lesions. *Breast* 2006; 15(6): 705–712. doi: 10.1016/j.breast.2005.11.005.
28. Liao KC, Lee WY, Chen MJ. Myoepithelial carcinoma: a rare neoplasm of the breast. *Breast Care (Basel)* 2010; 5(4): 246–249. doi: 10.1159/000313982.
29. Mastropasqua MG, Maiorano E, Pruneri G et al. Immunoreactivity for c-kit and p63 as an adjunct in the diagnosis of adenoid cystic carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2005; 18(10): 1277–1282. doi: 10.1038/modpathol.3800423.
30. Hsiao YH, Su YA, Tsai HD et al. Increased invasiveness and aggressiveness in breast epithelia with cytoplasmic p63 expression. *Int J Biol Sci* 2010; 6(5): 428–442.
31. Choi J, Kim D, Koo JS. Secretory carcinoma of breast demonstrates nuclear or cytoplasmic expression in p63 immunohistochemistry. *Int J Surg Pathol* 2012; 20(4): 367–372. doi: 10.1177/1066896912440506.
32. Xu Z, Wang W, Deng CX et al. Aberrant p63 and WT-1 expression in myoepithelial cells of pregnancy-associated breast cancer: implications for tumor aggressiveness and invasiveness. *Int J Biol Sci* 2009; 5(1): 82–96.
33. Alomari AK, Glusac EJ, McNiff JM. p40 is a more specific marker than p63 for cutaneous poorly differentiated squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 2014; 41(11): 839–845. doi: 10.1111/cup.12388.
34. Lehmann BD, Pietschmann JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol* 2014; 232(2): 142–150. doi: 10.1002/path.4280.
35. Hanker L, Karn T, Ruckhaeberle E et al. Clinical relevance of the putative stem cell marker p63 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122(3): 765–775. doi: 10.1007/s10549-009-0608-6.
36. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M et al. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch* 2005; 447(4): 688–694. doi: 10.1007/s00428-005-0010-7.
37. Koker MM, Kleer CG. p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28(11): 1506–1512.
38. Matkovic B, Juretic A, Separovic V et al. Immunohistochemical analysis of ER, PR, HER-2, CK 5/6, p63 and EGFR antigen expression in medullary breast cancer. *Tumori* 2008; 94(6): 838–844. doi: 10.1089/jpm.2016.0362.
39. Cimino-Mathews A, Sharma R, Illei PB et al. A subset of malignant phyllodes tumors express p63 and p40: a diagnostic pitfall in breast core needle biopsies. *Am J Surg Pathol* 2014; 38(12): 1689–1696. doi: 10.1097/PAS.0000000000000301.
40. Yamaguchi R, Tanaka M, Kondo K et al. Characteristic morphology of invasive micropapillary carcinoma of the breast: an immunohistochemical analysis. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40(8): 781–787. doi: 10.1093/jcco/hyq056.
41. Brattthauer GL, Saenger JS, Strauss BL. Antibodies targeting p63 react specifically in the cytoplasm of breast epithelial cells exhibiting secretory differentiation. *Histopathology* 2005; 47(6): 611–616. doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02282.x.
42. Kim SK, Jung WH, Koo JS. p40 (Δ Np63) expression in breast disease and its correlation with p63 immunohistochemistry. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(3): 1032–1041.
43. Aghazadeh S, Yazdanparast R. Activation of STAT3/HIF-1 α /Hes-1 axis promotes trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells via down-regulation of PTEN. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1861(8): 1970–1980. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.05.009.
44. Sailer V, Lüders C, Kuhn W et al. Immunostaining of Δ Np63 (using the p40 antibody) is equal to that of p63 and CK5/6 in high-grade ductal carcinoma in situ

- of the breast. *Virchows Arch* 2015; 467(1): 67–70. doi: 10.1007/s00428-015-1766-z.
45. Coates PJ, Nenuil R, Holcakova J et al. p63 isoforms in triple-negative breast cancer: ΔNp63 associates with the basal phenotype whereas TAp63 associates with androgen receptor, lack of BRCA mutation, PTEN and improved survival. *Virchows Arch* 2018; 472(3): 351–359. doi: 10.1007/s00428-018-2324-2.
46. Signoretti S, Pires MM, Lindauer M et al. p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(32): 11355–11360. doi: 10.1073/pnas.0500165102.
47. Signoretti S, Waltregny D, Dilks J et al. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol* 2000; 157(6): 1769–1775. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64814-6.
48. Parsons JK, Gage WR, Nelson WG et al. p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. *Urology* 2001; 58(4): 619–624.
49. Humphrey PA. Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *J Clin Pathol* 2007; 60(1): 35–42. doi: 10.1136/jcp.2005.036442.
50. Tan HL, Haffner MC, Esopi DM et al. Prostate adenocarcinomas aberrantly expressing p63 are molecularly distinct from usual-type prostatic adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2015; 28(3): 446–456. doi: 10.1038/modpathol.2014.115.
51. Osunkoya AO, Hansel DE, Sun X et al. Aberrant diffuse expression of p63 in adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy and radical prostatectomy: report of 21 cases. *Am J Surg Pathol* 2008; 32(3): 461–467. doi: 10.1097/PAS.0b013e318157020e.
52. Dhillon PK, Barry M, Stampfer MJ et al. Aberrant cytoplasmic expression of p63 and prostate cancer mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(2): 595–600. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0785.
53. Rekhman N, Ang DC, Sima CS et al. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 2011; 24(10): 1348–1359. doi: 10.1038/modpathol.2011.92.
54. Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH et al. p40 (ΔNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2012; 25(3): 405–415. doi: 10.1038/modpathol.2011.173.
55. Houghton O, McCluggage WG. The expression and diagnostic utility of p63 in the female genital tract. *Adv Anat Pathol* 2009; 16(5): 316–321. doi: 10.1097/PAP.0b013e3181b507c6.
56. Sams RN, Gnepp DR. P63 expression can be used in differential diagnosis of salivary gland acinic cell and mucoepidermoid carcinomas. *Head Neck Pathol* 2013; 7(1): 64–68. doi: 10.1007/s12105-012-0403-2.
57. Zhang HJ, Xue WC, Siu MK et al. P63 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with proliferation and apoptotic dynamics. *Int J Gynecol Pathol* 2009; 28(2): 172–178. doi: 10.1097/PGP.0b013e318189555b.

Význam membránových proteinů v léčbě nádorových onemocnění a možnosti jejich dalšího studia

Importance of Membrane Proteins in the Treatment of Tumor Diseases and the Possibilities of Their Further Study

Dosedělová L., Nekulová M., Zahradníková M., Faktor J., Vojtěšek B., Herychová L.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Proteiny buněčné cytoplazmatické membrány představují heterogenní skupinu proteinů s odlišnou strukturou, lokalizací a funkcí. Účastní se mnoha buněčných procesů, mezi něž patří zprostředkování buněčné signalizace nebo komunikace s vnějším prostředím i mezi buňkami samotnými. Mutace a posttranslační modifikace mění fyzikálně-chemické vlastnosti membránových proteinů a tím výrazně zasahují i do procesu kancerogeneze. Membránové proteiny tak představují důležité cíle pro diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění. V současnosti je cílená léčba v podobě monoklonálních protilátek nebo nízkomolekulárních inhibitorů namířena především na receptory růstových faktorů na povrchu nádorových buněk a různé typy molekul vč. cílů tzv. checkpoint inhibitorů na povrchu buněk imunitního systému. K lepšímu poznání vlastností a funkcí membránových proteinů v souvislosti s vývojem nových cílených přístupů v terapii jsou v současnosti intenzivně využívány proteomické a molekulárně biologické přístupy. **Cíl:** Cílem tohoto článku je přiblížit vlastnosti a funkce různých skupin membránových proteinů a přehledně shrnout jejich aktuální význam a potenciál využití v onkologii. Pozornost je zaměřena na ty skupiny proteinů, které se podílejí na regulaci proliferace nádorových buněk, ovlivňují imunitní odpověď, lékovou rezistenci a metastazování a představují již běžně využívané nebo potenciální cíle biologické léčby. Podrobněji jsou popsány glykosylace a fosforylace jako typické a nejvíce prostudované posttranslační modifikace membránových proteinů a dále hmotnostní spektrometrie jako efektivní nástroj pro identifikaci a kvantifikaci membránových proteinů.

Klíčová slova

membránové proteiny – glykosylace – fosforylace – proteomická analýza – cílená léčba

Tato práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Lenka Dosedělová
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: lenka.dosedelova@mou.cz

Přijato/Accepted: 3. 8. 2018

doi: 10.14735/amko20182532

Summary

Background: The proteins of the cellular cytoplasmic membrane represent a heterogeneous group of proteins with different structures, localizations, and functions. They participate in many cellular processes including cellular signaling and communication with the external environment and communication between cells. Mutations and post-translational modifications alter the chemical-physical properties of membrane proteins and thus significantly affect the process of carcinogenesis. Therefore, membrane proteins represent important targets for the diagnosis and treatment of cancer. Nowadays, treatment in the form of monoclonal antibodies or low molecular weight inhibitors targets mainly receptors of growth factors on the surface of tumor cells and various types of molecules including the targets of the so-called checkpoint inhibitors on the surface of the cells of the immune system. In order to better understand the properties and functions of membrane proteins, especially with the perspective of developing new targeted approaches in therapy, mainly proteomic and molecular biological approaches are currently being used.

Aim: The aim of this article is to describe the properties and functions of different groups of membrane proteins and to summarize their current relevance and potential for use in oncology. Attention is focused on those groups that regulate the proliferation of tumor cells, affect the immune response, cause drug resistance and metastasis, and are already used or accepted as potential targets of biological therapy. Glycosylation and phosphorylation are described in detail as the most studied post-translational modification of membrane proteins, and mass spectrometry is presented as an effective tool for the identification and quantification of membrane proteins.

Key words

membrane proteins – glycosylation – phosphorylation – proteomic analysis – targeted therapy

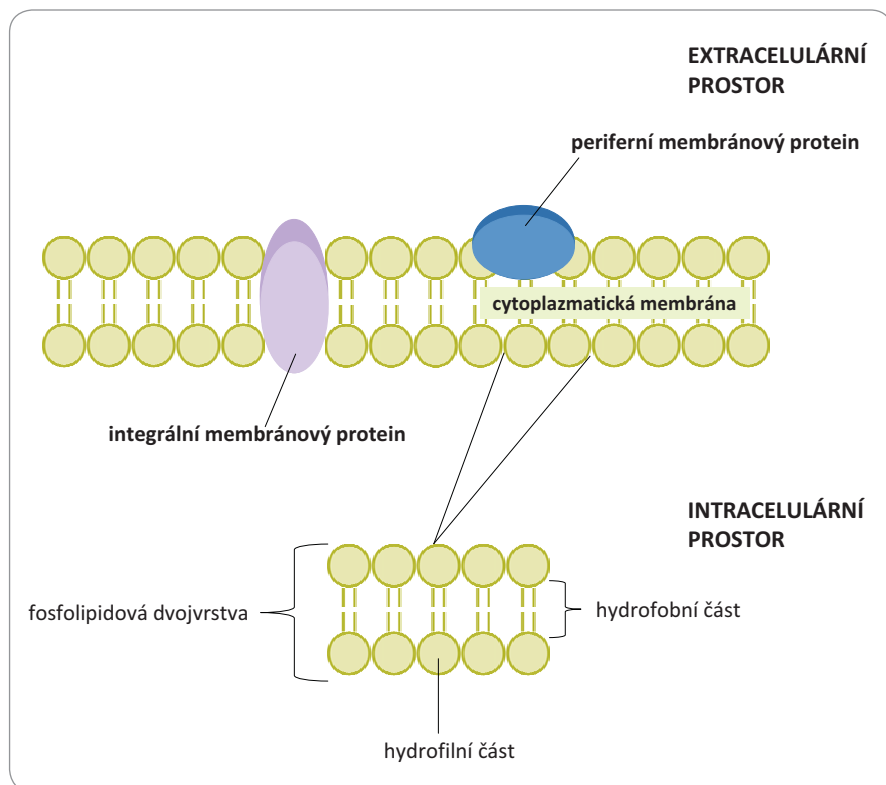
Úvod

Jako membránové se označují všechny proteiny, které procházejí jakoukoliv membránou v buňce nebo jsou s ní asociovány. Představují asi 30 % z celkového počtu lidských proteinů [1] a jsou

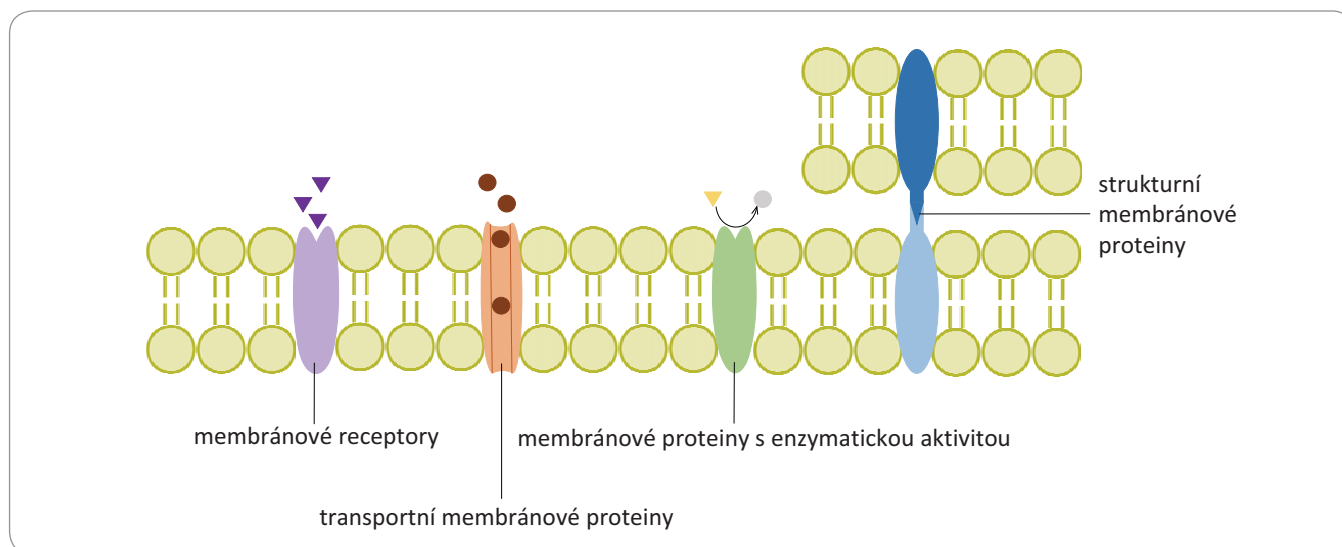
nezbytné pro zprostředkování buněčné signalizace, interakcí mezi buňkami a interakcí buněk s okolním prostředím [2]. Z hlediska nádorové biologie mají největší význam proteiny lokalizované ve vnější buněčné cytoplazmatické mem-

bráně, které hrají důležitou roli v průběhu vzniku a progresu primárního nádoru a při metastazování nádorových buněk [2]. Studium membránových proteinů se tak ukázalo být nezbytné pro pochopení procesu kancerogeneze a získané poznatky mohou být využity v cílené léčbě nádorových onemocnění.

V obraně proti nádorovým buňkám je důležité zapojení imunitního systému. Imunitní reakce proti nádorové buňce vzniká, pokud jsou na povrchu buňky prezentovány nádorové antigeny. V případě, že jsou nádorové buňky podobné buňkám normálním, jsou imunitním systémem tolerovány. V mechanismech úniku nádorových buněk před imunitní odpovědí hrají podstatnou úlohu membránové proteiny, které jsou nádorovými buňkami využívány např. při ztrátě imunogenicity (expresí povrchových ligandů inhibujících T lymfocyty imunitního systému, např. PD-L1) nebo při ztrátě antigenicity (snížením exprese či mutací imunogenních nádorových antigenů, např. změnou funkce hlavního imunohistokompatibilního systému) [3]. Kromě změny exprese povrchových proteinů důležitých pro reakci imunitního systému mohou mít nádorové buňky i pozměněnou expresi receptorů růstových faktorů (např. zvýšená exprese receptoru 2 pro lidský epidermální růstový faktor (human epidermal growth factor receptor-2 – HER2) u karcinomu prsu) nebo povrchových strukturních proteinů (např. ztráta adhezních molekul v procesu metastazování) [4].



Obr. 1. Struktura cytoplazmatické membrány a umístění periferních a integrálních membránových proteinů. Cytoplazmatická membrána je tvořena dvěma fosfolipidovými vrstvami. Jejich hydrofobní vnitřní část je tvořena řetězci mastných kyselin a polární část představují hydrofilní hlavičky fosfolipidů. Integrální (transmembránové) proteiny interagují s hydrofobní částí fosfolipidové membrány, periferní membránové proteiny s touto částí neinteragují.



Obr. 2. Rozdělení membránových proteinů podle funkce. Membránové receptory přenáší signál z extracelulárního prostoru dovnitř buňky po navázání ligandu. Transportní membránové proteiny tvoří hydrofilní kanály procházející cytoplazmatickou membránou, k přenosu látek mohou využívat energii z hydrolýzy adenosin trifosfátu. Membránové proteiny s enzymatickou aktivitou se podle polohy enzymaticky aktivního místa mohou označovat jako ektoenzymy či endoenzymy (na obrázku znázorněn ektoenzym). Strukturní membránové proteiny zajišťují protein-proteinové a protein-lipidové interakce.

Membránové proteiny lze rozdělit do skupin na základě jejich lokalizace, funkce či struktury [1]. Podle rozdílného napojení na fosfolipidovou dvojvrstvu cytoplazmatické membrány se dále dělí na periferní a integrální (jejich lokalizace je znázorněna na obr. 1). Integrální membránové proteiny ve většině případů interagují s fosfolipidovou dvojvrstvou, některé se připojují pouze k jedné vrstvě fosfolipidů (proteiny ukotvené lipidy). Periferní membránové proteiny neinteragují s hydrofobní částí fosfolipidové membrány a vážou se pomocí specifických protein-proteinových interakcí [5].

Dle funkce lze membránové proteiny dělit do několika základních skupin – 1. receptory spojené s a) G-proteiny, b) iontovými kanály a c) tyrozinkinázami; 2. transportní proteiny; 3. strukturní proteiny a 4. proteiny s enzymatickou aktivitou (obr. 2) [1].

Membránové proteiny a jejich význam

Nejlépe charakterizovanou skupinou membránových proteinů jsou receptory spojené s G-proteiny, iontovými kanály a tyrozinkinázami [1]. Receptory spojené s tyrozinkinázami jsou hlavními mediátory signálních drah, přenášejí extracelulární signál do buňky a řídí např. bu-

něčnou diferenciaci a proliferaci [6]. Typickým znakem nádorových buněk je zvýšená proliferace, která nastává mimo jiné v důsledku nadměrné aktivity těchto receptorů. Ta je obvykle způsobena různými typy mutací, příkladem jsou receptory pro růstové faktory, jako je EGFR (epidermal growth factor receptor), HER2, VEGFR (vascular endothelium growth factor receptor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) a IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor). Druhá možnost, která vede ke konstitutivní aktivaci těchto receptorů a následnému neregulovanému růstu buněk, je nadměrná produkce jejich ligandů, tj. růstových faktorů [6]. Cílem léčby zaměřené na tento typ membránových proteinů je inhibice receptorů spojených s tyrozinkinázami pomocí monoklonálních protilátek, antagonistických ligandů nebo nízkomolekulárních inhibitorů tyrozinkinázové aktivity [6]. Příklady léčiv zaměřených na tento typ receptorů jsou dnes už běžně používané monoklonální protilátky trastuzumab (Herceptin®), cetuximab (Erbix®) a panitumumab (Vectibix®). Ke známým zástupcům nízkomolekulárních inhibitorů patří např. gefitinib (Iressa®), lapatinib (Tykerb®, Tyverb®), sunitinib (Sutent®), sorafenib (Nexavar®) a další (kompletní

přehled všech monoklonálních protilátek a nízkomolekulárních inhibitorů schválených The Food and Drug Administration (FDA) nebo The European Medicines Agency (EMA) pro použití v onkologii je uveden v tab. 1 a tab. 2).

Ze skupiny membránových transportních proteinů mají v onkologii význam především tzv. ABC (ATP-binding cassette) transportéry. Jedná se o transmembránové proteiny, které využívají energii z rozkladu adenosin trifosfátu (adenosine triphosphate – ATP) pro přenos různých substrátů přes buněčnou membránu. Transportéry ze skupiny ABC B jsou zodpovědné za vznik tzv. mnohčetné lékové rezistence (multidrug resistance – MDR), tedy rezistence vůči léčivům s různou strukturou i funkcí. Léčiva jsou pomocí transportérů vylučována z buněk a dochází ke snížení jejich intracelulární hladiny, přičemž tuto lékovou rezistenci nelze překonat zvýšením dávky terapeutika [7]. Nejvíce studovanými proteiny, které se podílejí na vzniku rezistence, jsou ABCB1 (P-glycoprotein – MDR1), ABCC1 (multi drug resistance associated protein – MRP1) a ABCG2 (breast cancer resistance protein – BCRP) [8]. Jediným možným řešením takto vzniklé rezistence je nasazení jiného typu léčiva, které není substrátem

Tab. 1. Monoklonální protilátky schválené FDA nebo EMA pro použití v onkologii [52–54].

Monoklonální protilátka	Komerční název protilátky	Cílový protein	Využití v onkologii
ado-trastuzumab emtasin (konjugát s cytotoxickým emtasinem)	Kadcyla	HER2	mBC
alemtuzumab	Campath, Lemtrada	CD52	chronická B-lymfocytární leukemie
atezolizumab	Tecentriq	PD-L1	urotelální karcinom, mNSCLC
avelumab	Bevacio	PD-L1	metastatický karcinom z Merkelových buněk
bevacizumab	Avastin	VEGF	mCRC
blinatumomab	Blinicyto	CD19	ALL, prekurzorová B-lymfocytární
brentuximab vedotin (konjugát s cytotoxickým monomethylauristatinem E)	Adcentris	CD30	Hodgkinův lymfom, anaplastický velkobuněčný lymfom
capromab pendetid (radioznačený)	ProstaScint	PSMA	zobrazovací diagnostika pro nově diagnostikovaný karcinom prostaty nebo po prostatektomii
catumaxomab (bispecifický)	Removab	EpCAM, CD3	maligní ascites u pacientů s karcinomy pozitivními pro EpCAM
cetuximab	Erbix	EGFR	mCRC
daratumumab	Darzalex	CD38	MM
dinutuximab	Unituxin	GD2	neuroblastom vysokého rizika
durvalumab	Imfinzi	PD-L1	urotelální karcinom
elotuzumab	Empliciti	SLAMF7	MM
ibritumomab tiuxetan (radioimunoterapeutický)	Zevalin	CD20	relabovaný nebo refrakterní low-grade, folikulární nebo transformovaný B-buněčný ne Hodgkinův lymfom
ipilimumab	Yervoy	CTLA-4	metastatický melanom
necitumumab	Portrazza	EGFR	metastatický spinocelulární NSCLC
nivolumab	Opdivo	PD-1	metastatický melanom, metastatický spinocelulární NSCLC
obinutuzumab	Gazyva	CD20	CLL
ofatumumab	Arzerra	CD20	CLL
olaratumab	Lartruvo	PDGFR α	sarkomy měkkých tkání
panitumumab	Vectibix	EGFR	mCRC
pembrolizumab	Keytruda	PD-1	metastatický melanom
pertuzumab	Perjeta	HER2	mBC
ramucirumab	Cyramza	VEGFR2	karcinom žaludku
rituximab	Rituxan	CD20	B-buněčný ne Hodgkinův lymfom
trastuzumab	Herceptin	HER2	mBC
kombinace rituximabu a hyaluronidázy	Rituxan Hycela	CD20	folikulární lymfom, difúzní B-velkobuněčný lymfom, CLL
inotuzumab ozogamicin (konjugát s cytotoxickým ozogamicinem)	Besponsa	CD22	ALL, prekurzorová B-lymfocytární

Tab. 1 – pokračování. Monoklonální protilátky schválené FDA nebo EMA pro použití v onkologii [52–54].

Monoklonální protilátka	Komerční název protilátky	Cílový protein	Využití v onkologii
gemtuzumab ozogamicin (konjugát s cytotoxickým ozogamicinem)	Mylotarg	CD33	AML
bevacizumab – awwb (biosimilární monoklonální protilátka bevacizumabu)	Mvasi	VEGF	mCRC, nespinozellulární NSCLC, glioblastom, metastatický RCC, karcinom děložního hrdla
trastuzumab – dkst (biosimilární monoklonální protilátka trastuzumabu)	Ogivri	HER2	BC s nadměrnou expresí HER2, metastatický adenokarcinom žaludku a gastroezofageální junkce

FDA – Food and Drug Administration, EMA – European Medicines Agency, mBC – metastatický karcinom prsu, mNSCLC – metastatický nemalobuněčný karcinom plic, mCRC – metastatický kolorektální karcinom, MM – mnohočetný myelom, CLL – chronická lymfocytární leukemie, ALL – akutní lymfoblastická leukemie, AML – akutní myeloidní leukemie, RCC – karcinom ledviny

Tab. 2. Nízkomolekulární inhibitory tyrozin kinázových receptorů schválené FDA pro použití v onkologii [53,55].

Nízkomolekulární inhibitory	Komerční název	Cílový protein	Využití v onkologii
afatinib	Gilotrif, Gitrif, Tovok	EGFR, ErbB2, ErbB4	NSCLC
axitinib	Inlyta	VEGFR1/2/3, PDGFR β	pokročilý RCC
cabozantinib	Cabometyx, Cometriq	RET, MET, VEGFR1/2/3, Kit, TrkB, Flt3, Axl, Tie2	metastatický medulární karcinom štítné žlázy
erlotinib	Tarceva	EGFR	NSCLC, karcinom slinivky břišní
gefitinib	Iressa	EGFR	NSCLC
lapatinib	Tykerb	EGFR, ErbB2	BC
lenvatinib	Lenvima	VEGFR1/2/3, PDGFR, FGFR, Kit, RET	diferencovaný karcinom štítné žlázy
midostaurin	Rydapt	Flt3, PDGFR, VEGFR, PKC	AML, mastocytóza, leukemie ze žírných buněk
neratinib	Nerlynx	ErbB2/HER2	HER+ BC
osimertinib	Tagrisso	EGFR T970M	NSCLC
pazopanib	Votrien	VEGFR1/2/3, PDGFR α/β , FGFR1/3, Kit, Lck, Fms, Itk	RCC, sarkomy měkkých tkání
regorafenib	Stivarga	VEGFR1/2/3, BCR-Abl, B-Raf, Braf (V600E), Kit, PDGFR α/β , RET, FGFR1/2, Tie2, Eph2A	mCRC
sorafenib	Nexavar	VEGFR1/2/3, B-/C-Raf, mutant B-Raf, Kit, Flt3, RET, PDGFR β	diferencovaný karcinom štítné žlázy, hepatocelulární karcinom, RCC
sunitinib	Sutent	PDGFR α/β , VEGFR1/2/3, Kit, Flt3, CSF-1R, RET	RCC, gastrointestinální stromální tumor, neuroendokrinní tumor pankreatu
vandetinib	Caprelsa, Zactima	EGFRs, VEGFRs, RET, Brk, Tie2, EphRs, Src rodina kináz	medulární karcinom štítné žlázy

FDA – Food and Drug Administration, NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic, RCC – karcinom ledviny, mCRC – metastatický kolorektální karcinom, BC – karcinom prsu, AML – akutní myeloidní leukemie

pro ABC transportéry (např. alkylační látky nebo antimetaboly) nebo použití tzv. MDR modulátorů jako chemosenzibilizátorů. MDR modulátory jsou podávány společně s chemoterapeutikem a fungují převážně jako konkurenční substráty ABC transportérů. V současnosti pokračuje výzkum a klinické testování druhé generace MDR modulátorů, které by měly vykazovat vyšší účinnost a nižší toxicitu oproti MDR modulátorům první generace [7].

Významné cíle protinádorové léčby představují i tzv. CD (cluster of differentiation) molekuly. CD nomenklatura byla původně zavedena pro epitopy monoklonálních protilátek používaných pro imunofenotypizaci leukocytů, dnes je takto označována heterogenní skupina přibližně 400 membránových proteinů s různou strukturou a funkcí [9]. Pro označení CD je třeba prokázat, že danou molekulu vážou spolehlivě alespoň dvě monoklonální protilátky. Protože se jedná o molekuly na povrchu buněk dobře dostupné pro vazbu protilátek, jsou některé z nich vhodné pro cílenou léčbu zvláště v hematonekologii (tab. 1). Typickým příkladem je CD20 na povrchu B lymfocytů, který je cílem monoklonálních protilátek, jako jsou např. rituximab, ofatumumab a obinutuzumab při léčbě B-buněčných lymfomů a leukemií (tab. 1).

Nádorové buňky mají vyvinuty různé mechanismy, které jim umožňují uniknout imunitní odpovědi. Jedním z nich je exprese povrchových proteinů, které interagují s buňkami imunitního systému (T lymfocyty) a tím blokují jejich proliferaci a spouštějí apoptózu. V současnosti jsou intenzivně zkoumány a v onkologické léčbě stále více využívány tzv. checkpoint inhibitory. Jedná se o látky (obvykle monoklonální protilátky), které blokují interakce mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému a tím brání utlumení imunitní odpovědi. Jde především o zablokování interakce proteinu PD1 (programmed cell death 1, CD279) na povrchu lymfocytů a PD-L1 (programmed cell death-ligand 1, CD274) na povrchu nádorových buněk protilátkami nivolumab, pembrolizumab a atezolizumab (tab. 1). Na stejném principu funguje i blokáda

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4, CD152) protilátkou ipilimumab.

Také membránové strukturální proteiny mají svůj význam v onkologii, zatím se je však nepodařilo účinně využít pro cílenou léčbu. Jedná se především o tzv. buněčné adhezni molekuly (cell adhesion molecules – CAMs), jako jsou např. kadheriny, integriny nebo selektiny [1]. Změny ve složení a funkci adhezni molekul hrají zásadní roli v procesu metastazování. Podílejí se na regulaci buněčné adheze, migrace a invaze, ale i proliferace a apoptózy (integriny), na tvorbě mezibuněčných spojů, tvorbě krevních cév a jejich stabilizaci (kadheriny) [10], na vazbě sacharidových struktur, a tedy i na extravazaci nádorových buněk z krevního oběhu do tkáně (selektiny) [11]. Význam tohoto typu membránových proteinů potvrzuje i fakt, že v 90 % případů je příčinou úmrtí onkologických pacientů metastazování primárního nádoru a nikoliv samotný primární nádor [12]. V preklinických studiích byly testovány protilátky, specifické peptidy a dalších molekuly cílící na adhezni molekuly s cílem blokovat metastazování nádorových buněk, žádná z těchto látek však zatím není běžně používána v klinické praxi [13–15].

Posttranslační modifikace

Posttranslační modifikace jsou kovalentní modifikace proteinů vznikající v průběhu nebo po ukončení jejich syntézy a ovlivňují jejich fyzikální a chemické vlastnosti, a tedy i stabilitu a molekulární funkce. Rozmanitost modifikací rozšiřuje spektrum funkčních vlastností proteinů a liší se u normálních a nádorových buněk [4]. Za posttranslační modifikace označujeme fosforylace, hydroxylace, glykosylace, alkylace, acylace, sumoylace, ubikvitinace, neddylace, ISGylace a další méně časté typy modifikací. Nejčastěji studovanými posttranslačními modifikacemi membránových proteinů v nádorové biologii jsou pak fosforylace a glykosylace.

Fosforylace proteinu vzniká kovalentním připojením zbytku kyseliny fosforečné k postranním řetězcům různých aminokyselin nejčastěji tyrozinu, serinu

a threoninu. Jedná se o reverzibilní posttranslační modifikaci, která hraje klíčovou roli v regulaci buněčné signalizace a metabolismu. Fosforylace je velice přísně regulovaná působením enzymů kináz a fosfatáz [16,17]. Fosfoproteiny jsou obecně přítomny v buňce jen ve velmi nízkých koncentracích, přesto reverzibilní fosforylace/defosforylace umožňuje buňce rychle reagovat na vnitřní a vnější stimuly. Pro nádorové buňky je typická abnormální fosforylace proteinů [18,19], projevující se např. konstitutivní aktivací receptorových tyrozin kináz [6]. Pro identifikaci nových, dosud nepopsaných fosfoproteinů a konkrétních změn fosforylace specifických pro nádorové buňky lze využít kvantitativní proteomickou analýzu [20].

Glykosylace je další častou posttranslační modifikací membránových proteinů, glykosylováno je až 70 % všech lidských proteinů [21]. Za glykoprotein je považován posttranslačně modifikovaný protein, k němuž jsou enzymaticky připojeny oligosacharidové struktury nazývané glykany. Proces glykosylace probíhá převážně v endoplazmatickém retikulu nebo Golgiho aparátu. Pro nádorové buňky je ve srovnání s normálními buňkami typická zvýšená produkce větvených glykanových struktur (tzv. tří a více antennární) a/nebo změněné hladiny glykoproteinů [22]. Za změny v glykosylačním profilu jsou nejčastěji odpovědné N-glykany, kovalentně vázané N-glykosidickou vazbou na dusík postranního řetězce asparaginu [22], a O-glykany, kovalentně připojené k postranní hydroxylové skupině serinu nebo threoninu [23]. Větvené glykany nabízejí více možností pro navázání sialové kyseliny, která obvykle ukončuje jednotlivé větve glykanové struktury [24,25]. Změny v sialylaci membránových proteinů nádorových buněk ovlivňují jejich interakce s dalšími buňkami a s extracelulární matrix a tím i schopnost metastazovat [26]. Zvýšená exprese terminální α -2-6 vázané sialové kyseliny v N-glykanech a sialyl-Lewis-X v O-glykanech (typicky v mucinózním typu O-glykanů) často koreluje se špatnou prognózou onemocnění, protože podporuje invazivitu a metastazování nádorových buněk [27–29].

Analyzovat glykanové struktury není jednoduchý úkol. Na rozdíl od proteinů probíhá syntéza glykanů beztemplátovým procesem a výsledná glykanová struktura je produktem působení mnoha vysoce specifických a striktně regulovaných glykosidáz a glykosyltransferáz. Nádorová buňka obvykle vykazuje významně pozměněnou expresi a aktivitu obou typů enzymů podílejících se na tvorbě glykanových struktur, čímž dochází ke zvýšení glykosylace a změně zastoupení jednotlivých glykanů. Nejvýznamnější změny byly zaznamenány u sialyltransferáz a fukosyltransferáz, jejichž produkty jsou polysialylované a polyfukosylované glykanové struktury. Dobře charakterizované jsou změny N-glykosylace v séru pacientek s diagnostikovaným karcinomem prsu spočívající v markantním nárůstu sialylace a fukosylace glykanových struktur ve srovnání se zdravou populací [30,31].

Velkou skupinu silně glykosylovaných proteinů syntetizovaných epiteliálními buňkami reprezentují muciny. Pro muciny je charakteristická vysoká molekulová hmotnost, z níž 50–80 % zaujímá hmotnost glykanů, nejčastěji O-glykanů. Muciny tvoří významnou komponentu mukózních sekretů, které pokrývají epiteliální buňky gastrointestinálního, urogenitálního, dýchacího, očního a sluchového systému, ale současně bývají nadměrně syntetizovány i u většiny karcinomů [32]. Některé muciny jsou vázány v plazmatické membráně díky svému hydrofobnímu charakteru. Většina z nich je však sekretována, a může proto sloužit jako ligand adhezních receptorů jako např. selektinů, které podporují schopnost nádorových buněk interagovat s hostitelskými leukocyty, endotelovými buňkami nebo s krevními destičkami [33].

Mnohé glykoproteiny jsou v klinické praxi využívány jako diagnostické markery nebo markery progresu nádorových onemocnění, např. prostatický specifický antigen (prostate-specific antigen – PSA) u karcinomu prostaty [34], CA125 (carcinoma antigen 125) v případě karcinomu vaječníku [35], CEA (carcinoembryonic antigen) u kolorektálního karcinomu [36], CA19-9 (carcinoma antigen 19-9) u metastatického karcinomu slinivky břišní [34] nebo MUC1 (mucin 1). Membránový pro-

tein MUC1 je ukotven na vnějším povrchu epiteliálních buněk a je nadměrně exprimován u nádorů prsu, tlustého střeva, plic, slinivky břišní nebo vaječníku, a to současně s vysokou produkcí zkrácených O-glykanových struktur [37]. Syntetický peptid odvozený od MUC1 představuje hlavní složku vakcíny Tecemotide (Stimuvax), která stimuluje imunitní odpověď proti nádorovým buňkám exprimujícím MUC1. Vakcína je v současné době hodnocena ve dvou studiích fáze III u nemalobuněčného karcinomu plic a u estrogen receptor-pozitivních karcinomů prsu [38].

Identifikace a studium membránových proteinů pomocí proteomických metod

Membránové proteiny na povrchu nádorových buněk byly dříve obvykle identifikovány pomocí monoklonálních protilátek. V současnosti je proteomika moderním nástrojem pro studium změn proteomu vč. exprese či posttranslačních modifikací membránových proteinů [39]. Vstupním materiálem pro izolaci a detekci membránových proteinů mohou být stabilní buněčné linie, primokultury, nádorová tkáň, sérum či další tělní tekutiny [4]. Samotná analýza membránových proteinů je rozdělena do několika kroků – 1. obohacení vzorku a purifikace proteinů, 2. solubilizace a 3. separace, identifikace a charakterizace. Základní purifikační metody jsou chemická precipitace [40] a hustotní gradientová ultracentrifugace [40]. Další možností purifikace nebo obohacení membránových proteinů je využití rozsáhlé glykosylace membránových proteinů (magnetické kuličky s konkanalavalem A), elektrostatických interakcí (kladně nabitě křemíkové kuličky a záporně nabitě proteiny plazmatické membrány), chemické značení intaktních membránových proteinů nebo např. inkorporace do polymerů [40–44].

Moderní metoda izolace membránových proteinů využívá vysoké afinity a specifity biotinu a glykoproteinu vaječného bílku avidinu nebo příbuzného bakteriálního proteinu streptavidinu. Membránové proteiny jsou označeny modifikovaným biotinem (aminooxybiotin, sulfo-NHS-SS-biotin) [45] a ná-

sledně precipitovány kuličkami s navázaným streptavidinem [46]. Výsledkem je vzorek obohacený o membránové proteiny, jejichž koncentrace by jinak byla nedostatečná pro další analýzu. Pro následnou solubilizaci membránových proteinů se nejčastěji používají detergenty (např. dodecylsírán sodný – SDS) [40]. V závislosti na typu použitého detergentu se mohou projevit různé nežádoucí účinky při dalším zpracování vzorku. Jedná se např. o interferenci s kapalinovou chromatografií, inaktivaci proteázy během enzymatického štěpení, potlačení ionizace peptidů či kontaminace hmotnostního spektrometru [47]. Detergenty je tedy nutné před použitím tandemové hmotnostní spektrometrie (liquid chromatography-tandem mass spectrometry – LC-MS/MS) ze vzorku odstranit [40].

V posledním kroku separace, charakterizace a identifikace membránových proteinů se v případě proteomické analýzy obvykle využívá LC-MS/MS. Pro identifikaci a charakterizaci membránových proteinů lze použít dva hlavní proteomické přístupy. První přístup „top-down“ je založen na analýze proteinů nebo jednoduché proteinové směsi bez použití enzymatického štěpení. Naopak druhý „shotgun“ přístup se využívá pro identifikaci proteinů v komplexních biologických vzorcích a součástí tohoto přístupu je enzymatické štěpení všech proteinů s následným měřením na hmotnostním spektrometru [48].

Kvantifikaci membránových proteinů lze provést relativním nebo absolutním způsobem. V případě relativní kvantifikace lze porovnávat kvantitu proteinů dvou či více biologických systémů, např. metodou izotopového značení (label-based) [4,49]. Mezi label-based kvantifikační metody lze zařadit i metody s chemickým typem značení jako např. iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantification) [49], TMT (tandem mass tag) [50] nebo často využívanou metodu s metabolickým typem značení SILAC (stable isotope amino acids in cell culture). Metodu SILAC lze aplikovat pouze na živé organizmy *in vitro*, *in vivo* nebo *ex vivo*. Modifikovanou formu tohoto typu izotopového značení, tzv. super-SILAC, lze využít i pro vzorky tkání [49].

Další možností relativní kvantifikace je i tzv. label-free metoda bez využití izotopového značení [51].

Druhý, absolutní způsob kvantifikace přímo určuje koncentraci analyzovaného proteinu [51]. Před samotnou analýzou je však nutné znát konkrétní protein/peptid, který má být kvantifikován [49], protože principem metody je využití izotopově značeného syntetického peptidu jako vnitřního standardu [51].

Kvantitativní proteomika je moderním a důležitým nástrojem pro identifikaci a charakterizaci membránových proteinů izolovaných z definovaných buněčných linií nebo biologického materiálu, a tedy přispívá k pochopení funkce s nimi spojených signálních drah, jejich zapojení do procesu metastazování či regulace imunitní odpovědi.

Závěr

V současnosti dochází v onkologii k intenzivnímu rozvoji cílené léčby, což potvrzuje mimo jiné i narůstající počet nově schválených léčebných preparátů a rozšiřující se spektrum nádorových onemocnění, pro která je cílená léčba dostupná. Proteiny vnější cytoplazmatické membrány zde hrají ústřední roli jako cíle tohoto typu léčby. Proteomické přístupy ke studiu membránových proteinů mohou přinést nové znalosti vlastností a funkcí membránových proteinů, které v budoucnosti přispějí k vývoji nových monoklonálních protilátek, syntetických peptidů a nízkomolekulárních inhibitorů umožňujících rozšířit personalizovanou léčbu nádorových onemocnění.

Literatura

- Várady G, Cserepes J, Németh A et al. Cell surface membrane proteins as personalized biomarkers: where we stand and where we are headed. *Biomark Med* 2013; 7(5): 803–819. doi: 10.2217/bmm.13.90.
- Wu CC, Yates JR. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol* 2003; 21(3): 262–267. doi: 10.1038/nbt0303-262.
- Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2015; 21(4): 687–692. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1860.
- Leth-Larsen R, Lund RR, Ditzel HJ. Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9(7): 1369–1382. doi: 10.1074/mcp.R900006-MCP200.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL (eds). *Molecular cell biology*. 4. vydání. New York: W. H. Freeman 2000.
- Bennasroune A, Gardin A, Aunis D et al. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50(1): 23–38. doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.08.004.
- Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* 2005; 5: 30. doi: 10.1186/1475-2867-5-30.
- Fletcher JL, Haber M, Henderson MJ et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(2): 147–156. doi: 10.1038/nrc2789.
- Clark G, Stockinger H, Balderas R et al. Nomenclature of CD molecules from the tenth human leucocyte differentiation antigen workshop. *Clin Transl Immunol* 2016; 5(1): e57. doi: 10.1038/cti.2015.38.
- Blaschuk OW, Devemy E. Cadherins as novel targets for anti-cancer therapy. *Eur J Pharmacol* 2009; 625(1–3): 195–198. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.05.033.
- Barthel SR, Gavino JD, Descheny L et al. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11(11): 1473–1491. doi: 10.1517/14728222.11.11.1473.
- Karhemo PR, Hyvönen M, Laakkonen P. Metastasis-associated cell surface oncoproteins. *Front Pharmacol* 2012; 3: 192. doi: 10.3389/fphar.2012.00192.
- Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 676731. doi: 10.1155/2012/676731.
- Okegawa T, Pong RC, Li Y et al. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol* 2004; 51(2): 445–457. doi: 035001445.
- Huang YW, Baluna R, Vitetta ES. Adhesion molecules as targets for cancer therapy. *Histol Histopathol* 1997; 12(2): 467–477.
- Chong PK, Lee H, Kong JW et al. Phosphoproteomics, oncogenic signaling and cancer research. *Proteomics* 2008; 8(21): 4370–4382. doi: 10.1002/pmic.200800051.
- Sefton BM. *Current Protocols in Cell Biology*. 1. vydání. West Sussex: John Wiley & Sons 1998.
- Castellvi J, Garcia A, Ruiz-Marcellan C et al. Cell signaling in endometrial carcinoma: phosphorylated 4E-binding protein-1 expression in endometrial cancer correlates with aggressive tumors and prognosis. *Hum Pathol* 2009; 40(10): 1418–1426. doi: 10.1016/j.humpath.2008.
- McArdle L, Rafferty M, Maelandsmo GM et al. Protein tyrosine phosphatase genes downregulated in melanoma. *J Invest Dermatol* 2001; 117(5): 1255–1260. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01534.x.
- Pjehová M, Hernyčová L, Tomašec P et al. Analysis of phosphoproteins and signalling pathways by quantitative proteomics. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): 116–120. doi: 10.14735/amko201415116.
- Mechref Y, Muddiman DC. Recent advances in glycomics, glycoproteomics and allied topics. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409(2): 355–357. doi: 10.1007/s00216-016-0093-9.
- Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001; 291(5512): 2364–2369.
- Li H, d'Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(6): 678–684. doi: 10.1016/j.copbio.2009.10.009.
- Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N et al. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *J Hepatol* 2009; 50(3): 592–603. doi: 10.1016/j.jhep.2008.12.010.
- Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J* 1997; 14(5): 569–576.
- Schultz MJ, Swindall AF, Bellis SL. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31(3–4): 501–518. doi: 10.1007/s10555-012-9359-7.
- Seales EC, Jurado GA, Brunson BA et al. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* 2005; 65(11): 4645–4652. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3117.
- Hedlund M, Ng E, Varki A et al. alpha 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Res* 2008; 68(2): 388–394. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1340.
- Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* 2007; 87(9): 851–857. doi: 10.1038/labinvest.3700656.
- Kyselova Z, Mechref Y, Kang P et al. Breast cancer diagnosis and prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles. *Clin Chem* 2008; 54(7): 1166–1175. doi: 10.1373/clinchem.2007.087148.
- Arnold JN, Saldova R, Hamid UM et al. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics* 2008; 8(16): 3284–3293. doi: 10.1002/pmic.200800163.
- Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(1): 45–60. doi: 10.1038/nrc1251.
- Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(7): 526–542. doi: 10.1038/nrc1649.
- Maryáš J, Faktor J, Dvořáková M et al. Proteomics in investigation of cancer metastasis: functional and clinical consequences and methodological challenges. *Proteomics* 2014; 14(4–5): 426–440. doi: 10.1002/pmic.201300264.
- Streppel MM, Vincent A, Murkerjee R et al. Mucin 16 (cancer antigen 125) expression in human tissues and cell lines and correlation with clinical outcome in adenocarcinomas of the pancreas, esophagus, stomach, and colon. *Hum Pathol* 2012; 43(10): 1755–1763. doi: 10.1016/j.humpath.2012.01.005.
- Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47(4): 624–630.
- Burchell JM, Mungul A, Taylor-Papadimitriou J. O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6(3): 355–364.
- Sangha R, Butts C. L-BLP25: a peptide vaccine strategy in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(15 Pt 2): s4652–s4654. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0213.
- Mermelekas G, Zoidakis J. Mass spectrometry-based membrane proteomics in cancer biomarker discovery. *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14(5): 549–563. doi: 10.1586/14737159.2014.917965.
- Cordwell SJ, Thingholm TE. Technologies for plasma membrane proteomics. *Proteomics* 2010; 10(4): 611–627. doi: 10.1002/pmic.200900521.
- Lee YC, Block G, Chen H et al. One-step isolation of plasma membrane proteins using magnetic beads with immobilized concanavalin A. *Protein Expr Purif* 2008; 62(2): 223–229. doi: 10.1016/j.pep.2008.08.003.
- Kim Y, Elschreiberich S, Sharma P et al. Use of colloidal silica-beads for the isolation of cell-surface proteins for mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol Biol* 2011; 748: 227–241. doi: 10.1007/978-1-61779-139-0_16.
- Miki T, Fujishima S, Komatsu K et al. LDAL-based chemical labeling of intact membrane proteins and its pulse-chase analysis under live cell conditions. *Chem Biol* 2014; 21(8): 1013–1022. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.07.013.
- Lee SC, Knowles TJ, Postis VL et al. A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment. *Nat Protoc* 2016; 11(7): 1149–1162. doi: 10.1038/nprot.2016.070.
- Hörmann K, Stukalov A, Müller AC et al. A surface biotinylation strategy for reproducible plasma membrane

- protein purification and tracking of genetic and drug-induced alterations. *J Proteome Res* 2016; 15(2): 647–658. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b01066.
46. Rybak JN, Scheurer SB, Neri D et al. Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: a protocol for quantitative elution. *Proteomics* 2004; 4(8): 2296–2299. doi: 10.1002/pmic.200300780.
47. Vít O, Petrák J. Integral membrane proteins in proteomics. How to break open the black box? *J Proteomics* 2017; 153: 8–20. doi: 10.1016/j.jprot.2016.08.006.
48. Dvořáková P, Hernychová L, Vojtěšek B. Analysis of Protein Using Mass Spectrometry. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): 104–109. doi: 10.14735/amko20141S104.
49. Hernychová L, Dvořáková P, Michalová E et al. Quantitative mass spectrometry and its utilization in oncology. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): 98–103. doi: 10.14735/amko20141S98.
50. Gao W, Xu J, Wang F et al. Plasma membrane proteomic analysis of human Gastric Cancer tissues: revealing flotillin 1 as a marker for Gastric Cancer. *BMC Cancer* 2015; 15: 367. doi: 10.1186/s12885-015-1343-5.
51. Schey KL, Grey AC, Nicklay JJ. Mass Spectrometry of membrane proteins: a focus on aquaporins. *Biochemistry* 2013; 52(22): 3807–3817. doi: 10.1021/bi301604j.
52. actip.org. [online]. Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use (status 2017). Available from: <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/>.
53. fda.gov. [online]. USA: U. S. Food and Drug Administration. Available from: <https://www.fda.gov/>. <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/default.htm>
54. ema.europa.eu. [online]. European public assessment reports. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d12.
55. brimr.org. [online] From the Blue Ridge Institute for Medical Research in Horse Shoe, North Carolina USA. Available from: <http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm>.

Vliv metylace DNA na vznik nádorových onemocnění

Effect of DNA Methylation on the Development of Cancer

Holčáková J.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Výzkum posledního desetiletí potvrdil význam epigenetických procesů při vzniku, vývoji a léčbě nádorových onemocnění. Především sekvenování nové generace umožnilo zmapovat lidský epigenom a sledovat jeho změny během kancerogeneze. Tento přístup odhalil přímá napojení epigenetických abnormalit na mutace genů, které kontrolují metylaci DNA, sbalování a funkci DNA v chromatinu, nebo na metabolismus buněk. Epigenetické změny DNA se vyskytují už v časných fázích vývoje nádorových onemocnění, a jsou tedy slibnými kandidáty na diagnostické a prognostické markery a současně epigenetické procesy představují vhodné cíle pro vývoj nových terapeutických látek. Získané poznatky o aberantní metylaci DNA umožňují dva různé pohledy na to, jak daná modifikace přispívá k vývoji nádorového onemocnění. První pohled předpokládá, že normální buňky podléhají transformaci vlivem řídicích mutací, kdy následně metylace *de novo* a demethylace DNA přispívají k řadě programových změn genové exprese. Alternativní přístup pohlíží na změny v metylaci DNA jako na důsledek např. stárnutí buněk. A právě tyto získané změny zvyšují citlivost DNA ke vzniku mutací a k následné onkogenní transformaci. **Cíle:** Cílem přehledového článku je shrnout dosud známé úlohy abnormální metylace DNA při vývoji nádorového onemocnění a představit již publikovanou alternativní teorii, která k dané problematice přistupuje méně obvyklým způsobem.

Klíčová slova

metylace DNA – polycomb proteinový komplex – CpG ostrůvky

Summary

Background: Research in the last decade has confirmed the importance of epigenetic processes for the onset, development, and treatment of cancer. Next generation sequencing has allowed the inspection and mapping of the human epigenome and its monitoring for changes during carcinogenesis, which has revealed direct links between epigenetic abnormalities and mutations in genes that control DNA methylation and packing and those that function in chromatin dynamics and metabolism. Epigenetic changes that occur in the early stages of tumor progression thus represent promising candidates for diagnostic and prognostic markers, and epigenetic processes are suitable targets for the development of new therapeutic strategies. There are two contrasting views on how aberrant DNA methylation contributes to the development of cancer. The first view assumes that normal cells undergo transformation due to driver mutations and subsequent *de novo* methylation and DNA demethylation, resulting in global changes in gene expression. The second view considers changes in DNA methylation to be a consequence of cell aging, for example, and that the acquired changes increase the sensitivity of DNA to mutations and oncogenic transformation. **Aims:** The aim of the review article is to briefly summarize the role of abnormal DNA methylation in the development of cancer, and to present an alternative theory that considers the role of aberrant DNA methylation patterns in cancer from a new and unconventional perspective.

Key words

DNA methylation – polycomb-group proteins – CpG islands

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

The work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Jitka Holčáková, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
holcakova@mou.cz

Přijato/Accepted: 27. 8. 2018

doi: 10.14735/amko20182541

Úvod

Již během 80. let 20. století byly zaznamenány změny v metylaci DNA nádorových buněk [1] a pozdější intenzivní výzkum přinesl další znalosti o struktuře a modifikacích chromatinu a jejich vlivu na genovou expresi. Ukázalo se, že vznik a progresse nádorového onemocnění jsou podmíněny nejen genetickými, ale i epigenetickými změnami a do odborného jazyka tak vstupuje pojem „nádorový epigenom“. Sekvenování nové generace využívané pro zmapování chromozomů a metylaci DNA u normálních, nádorových nebo pluripotentních kmenových buněk přineslo nové poznatky o struktuře chromatinu a postavení nukleotidů a o tom, jak tyto změny přispívají ke vzniku a rozvoji různých onemocnění. Zároveň se tím otevřely možnosti pro nalezení nových nádorových markerů a terapeutických cílů.

Metylace DNA

Za základní epigenetický mechanismus je považována metylace DNA, tedy kovalentní připojení metylové skupiny k adeninu nebo cytosinu (u adeninu na 6. uhlík, u cytosinu na 4. nebo 5. uhlík) [2]. V savčím genomu se vyskytuje pouze 5-metylcytosin (5mC) v rámci CpG (cytosine-phosphatidyl-guanin) dinukleotidů [3]. Metylace DNA regulují expresi genů bez změny genetické informace a ovlivňují replikaci, rekombinaci a opravy DNA nebo sestřih heterogenní nukleární RNA. Působí tak na vývoj kmenových buněk, diferenciaci a udržování buněk a tkání. Dále se podílejí na zachování genomové stability, potlačují transkripci repetitivních sekvencí a retrovirové DNA, zabraňují translokaci transponovatelných elementů a během zárodečného vývoje kontrolují expresi imprintovaných genů. Změny v epigenetických regulačních mechanismech probíhají během procesu stárnutí a za patologických podmínek přispívají ke vzniku rakoviny nebo autoimunitních a degenerativních onemocnění [4].

Metylace DNA je zprostředkována DNA metyltransferázami (DNMTs), které využívají jako zdroj metylové skupiny S-adenosylmethionin. DNMT1 je zodpovědná za udržovací metylace, kdy katalyzuje připojení metylové skupiny

k dinukleotidu CpG na hemimetylovaných vláknech DNA během replikace. DNMT3A a DNMT3B zajišťují metylaci *de novo* [5]. Ztráta metyltransferázy DNMT1, která zajišťuje dědičné metylační vzory DNA, je letální. [6].

Demetylaci DNA řídí translokační proteiny TET (tet methylcytosine dioxygenase), které katalyzují konverzi 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin a následně na cytosin. Množství hydroxylovaných cytosinů v promotorech genů koreluje s jejich expresní aktivitou, přičemž přítomnost metylycytosinu vede k represi transkripcce. Modifikace DNA metylací přímo fyzicky brání transkripčním faktorům nasednout na jejich vazebné místo nebo se díky ní na DNA navážou tzv. proteiny vázající metylované CpG (methyl-CpG binding proteins – MBP), které mění chromatinovou strukturu a regulují tak vazbu dalších faktorů [7].

Metylace DNA u nádorů

U nádorových buněk se často vyskytuje komplexní ztráta metylace soustředěná do hypometylovaných bloků nebo naopak hypermetylace určitých oblastí [8]. Celogenomové sekvenování vzorků normální a nádorové tkáně tlustého střeva prokázalo, že ztráta metylace DNA není náhodná, ale většinou postihuje rozsáhlé oblasti (v řádu megabází) u mnoha chromozomů [9]. Jedná se především o jaderné oblasti spojené s laminem, kde probíhá pozdní replikace. Domény spojené s laminem tvoří asi 40 % genomu a obsahují repetitivní sekvence chudé na geny [10,11]. Předpokládá se, že hypometylace nepromotorových sekvencí DNA a strukturálních částí, jako je centromera, zvyšují genomovou nestabilitu [12] a mutace genů pro metyltransferázy, které vedou ke ztrátě metylace DNA, jsou spojovány se strukturálními změnami chromozomů [13]. Hypometylace promotorových sekvencí je zodpovědná za nadměrnou expresi protoonkogenů, růstových faktorů a genů zapojených do regulace proliferace, invazivity a metastazování nádorových buněk [14], hypometylace retrotransponů pak podporuje kancerogenezi destabilizací genomu prostřednictvím inzerčních mutací a rekombinací mezi nealelickými repeticemi [15].

Nejčastěji sledovanou epigenetickou změnou u nádorů je však nyní abnormální metylace DNA *de novo* u standardně nemetylovaných promotorů a s tím související potlačení transkripcce a ztráta genové exprese [16,17].

Hypermetylace CpG ostrůvků

CpG dinukleotidy nejsou v genomu zastoupeny často a většinou se soustřeďují do krátkých oblastí (0,5–4 kb) známých jako CpG ostrůvky. CpG ostrůvky byly během evoluce umístěny a zachovány v oblastech DNA, které mají funkční význam. Regulují chromatinovou strukturu, čímž ovlivňují vazbu transkripčních faktorů a výsledně i genovou expresi. U většiny genů savčího genomu se CpG ostrůvky nacházejí v počátečních oblastech promotorů a prvního exonu a v normálních buňkách obvykle nejsou metylovány. Metylace CpG ostrůvků vede ke stabilnímu snížení exprese těchto genů.

Mapování metylací DNA u nádorových buněk potvrdilo, že téměř všechny typy nádorů obsahují stovky genů s abnormální metylací, přičemž v normálních buňkách není 5–10 % CpG ostrůvků těchto promotorů od embryonálního vývoje nikdy metylováno [3]. Překvapivě jsou hypermetylace promotorů u nádorových buněk minimálně stejně tak časté jako výskyt mutací nádorových supresorů. Aberantní metylace promotoru spojené s jeho umlčením představují selektivní výhodu pro neoplastické buňky podobně jako mutace. Téměř 50 % genů, jejichž zárodečné mutace vedou k dědičným formám rakoviny, podléhá i hypermetylacii a následnému potlačení jejich exprese. Příkladem je gen *BRCA1* kódující nádorový supresor, jehož zárodečné mutace jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (breast cancer – BC). U 10–15 % žen s BC, které nenesly mutaci *BRCA1*, byla nalezena hypermetylace tohoto genu. Profily genové exprese BC s hypermetylovaným i mutovaným *BRCA1* jsou totožné, a je tedy zřejmé, že i důsledky obou typů aberací *BRCA1*, tj. mutace i hypermetylace, jsou stejné [18,19].

Předpokládá se, že ztráta exprese nádorových supresorů se fenotypově projeví jen v případě, že jsou inaktivovány obě alely genu. Některé studie však uká-

zaly, že jedna z alel genu může stabilně nést zárodečnou mutaci a druhá je inaktivována právě metylací [20]. Nicméně se zdá, že metylována je vždy jen wild type alela a nikdy ne alela mutovaná [21].

Podobně jako se mutace DNA často objevují u specifických genů (*TP53*, *KRAS* apod.), které působí jako spouštěče nádorového bujení, jsou známy i epigenetické změny, které se u nádorů vyskytují poměrně často. Příkladem jsou hypermetylace nádorového supresoru *VHL* u karcinomu ledvin nebo *CDKN2A* (kódující nádorové supresory *INK4A* a *ARF*) u karcinomu plic [22], jícnu [23], Burkittova lymfomu [24] nebo melanomu [25].

Seznam identifikovaných genů, u kterých dochází u různých typů nádorů ke snížení exprese v důsledku hypermetylace, se neustále rozšiřuje. Tyto geny jsou pravděpodobně důležité pro vývoj daného nádoru z podstaty jejich funkce, ale nepodléhají často mutacím. Příkladem je gen *MGMT* nezbytný pro genomovou stabilitu, růstový regulátor *CDKN2B* nebo supresor proliferace *RASSF1A* [26,27]. Předpokládá se, že hlavním působením metylací je jejich nahromadění do jednotlivých signálních drah, které napomáhají vzniku a vývoji rakoviny [28]. Příkladem jsou geny pro transkripční faktory *GATA4* a *GATA5*, které řídí epiteliální diferenciaci u karcinomu tlustého střeva a které bývají souběžně hypermetylovány spolu se svými cílovými geny [29]. Souběžně hypermetylací podléhají i geny negativně regulující signální dráhu WNT a doplňují tak vliv řídicích mutací *APC* a *CTNNB1*, které WNT dráhu naopak aktivují [30]. Součinnost různých hypermetylovaných genů navíc přispívá i k narušení signální dráhy p53.

Metylace DNA přispívá ke vzniku mutací DNA

Epigenetické změny často zvyšují riziko vzniku mutací v průběhu vývoje nádoru. Poprvé byl tento jev popsán u genu *MLH1*, který je často hypermetylován u nádorů s vysokou hladinou nestability mikrosatelitů, jako jsou nádory tlustého střeva a konečníku [31]. Dalším genem, který je nezbytný pro opravy DNA a podléhá hypermetylacii, je *MGMT*. *MGMT* kóduje protein O^6 -alkylguanin DNA

alkyltransferázu, který opravuje O^6 -metylguanin vznikající při působení karcinogenů zpět na guanin a zabraňuje tak vzniku mutací (tranzicí) $G \rightarrow A$. Nádory s umlčenými alelami genu *MGMT* jsou pak náchylné k mutacím v klíčových genech, jako je *TP53* nebo *KRAS* [32].

Metylace cytosinu může ovlivnit vznik a vývoj nádoru i jinými mechanismy, než je umlčení genové exprese. Samotná 5-metylace cytosinu je v podstatě mutagenní, protože může vést ke spontánní deaminaci a následné tranzici $C \rightarrow T$ [33]. Uvádí se, že až 50 % inaktivujících bodových mutací nádorového supresoru *TP53* u somatických buněk vychází z metylovaného cytosinu [34]. Přítomnost metylové skupiny u CpG v kódující oblasti *TP53* zvyšuje výskyt mutací vyvolaných UV zářením u nádorů kůže, protože zvyšuje citlivost cytosinu k oblasti spektra převládajícího u slunečního záření [35]. Metylované CpG jsou i cílem tranzičních mutací $C \rightarrow T$ vyvolaných karcinogenem benzo(a)pyren diol epoxid, který je přítomen v tabáku [36]. Skutečnost, že kódující sekvence *TP53* obsahuje velké množství metylovaných CpG, tedy může zvyšovat pravděpodobnost vzniku mutací tohoto genu.

Metylace DNA a polycomb proteiny

Metylace DNA je spojována především s potlačením genové exprese a předpokládá se, že její hlavní úlohou při tumorigenezi je inaktivace nádorových supresorů. Ačkoliv byl tento typ inhibice pozorován u nádorových buněčných linií [37], je tento pohled poněkud zjednodušený. Metylace CpG *de novo* se nevyskytuje pouze u nádorových buněk, ale v nízké hladině byly pozorovány i u normálních tkání a jejich množství se postupně navyšuje s věkem [3,38]. Podobně i demetylace typické pro nádorové buňky se objevují u normálních stárnoucích hematopoetických a epidermálních kmenových buněk *in vivo* [39].

Několik studií prokázalo, že většina genů metylovaných u nádorů *de novo* je transkripčně neaktivní i u normálních buněk, což je v souladu s tvrzením, že většina cílových genů pro metylaci je označena tzv. polycomb komplexem

(polycomb-group proteins – PcGs) [40]. PcGs představují rodinu proteinů, které využívají epigenetické mechanismy k udržení nebo potlačení exprese cílových genů. Původně byly objeveny u *Drosophila melanogaster*, ale jejich úloha v regulaci vývojových genů byla prokázána u mnoha živočišných druhů. PcGs potlačují transkripci genů nezbytných pro tvorbu vývojových linií z embryonálních nebo dospělých kmenových buněk [41,42]. Exprese těchto genů je během raného embryonálního vývoje potlačena vazbou PcGs, které zprostředkovávají metylaci histonu H3 pomocí histon metyl transferázy (EZH2), a dochází k lokální tvorbě fakultativního heterochromatinu. To je relativně plastická struktura, která může být jednoduše zrušena uvolněním PcGs a dochází k obnově transkripce [43]. Tato regulace bez přítomnosti abnormální metylace DNA promotorů byla pozorována u mnoha typů nádorů. Předpokládá se, že molekulární vývoj během tumorigeneze začíná abnormální expanzí dospělých kmenových buněk a progenitorů, kde u CpG ostrůvků v rámci promotorů dochází k nahrazování flexibilního umlčení genů pomocí PcGs mnohem stabilnější regulací spojenou s metylací DNA, která je zprostředkována *de novo* metylázami DNMT3A a 3B [44,45]. Je zřejmé, že spíše než potlačení aktivních genů postihuje metylace již umlčené geny a hlavní úlohou je zabránění jejich reaktivace [46].

Protože většina CpG, které podléhají změnám *de novo*, je standardně označena PcGs, jsou výsledné metylační vzory u všech tkání podobné, ačkoliv se intenzita metylací liší mezi jednotlivými nádory, např. je vysoká u nádorů střev nebo naopak nízká u nádorů mozku [47]. V principu zde tedy musí existovat další kontrolní mechanismy, které řídí metylace *de novo* a pravděpodobně vycházejí z vývojové historie jednotlivých buněčných typů. Například lokální záněty zvyšují pravděpodobnost nádorové transformace a metylace DNA je do těchto procesů také zapojena [48,49]. Podobně působí i oxidační stres, který přímo ovlivňuje vazbu DNA metyltransferáz na cílové geny označené PcGs [50].

Co bylo dříve, mutace, nebo metylace?

Podle Klutsteina et al lze na současně znalosti o metylacích DNA u nádorů nahlížet ze dvou stran [51]. Buď mohou 1. normální buňky podlehnout nádorové transformaci v důsledku genetické mutace a následná metylace a demethylace DNA vede k celkové programové změně genové exprese, nebo se 2. subpopulace buněk, u kterých došlo ke změnám v metylaci DNA, např. v důsledku stárnutí, stává náchylnější k onkogenní transformaci [49]. Podle druhého modelu je přítomnost abnormální metylace u nádoru důsledkem výběru primární buňky s charakteristickým metylačním fenotypem, ze které nádor vznikl. Pokud je tento fenotyp jednou ustanoven, přenáší se na dceřiné buňky podobně jako mutace. Velké množství důkazů napovídá, že metylace DNA souvisejí s nádory nebo stárnutím pochází z malé populace buněk. Jako příklad uvádí Klutstein et al vývoj nádorů tlustého střeva [51]. Střevní epitel se neustále obnovuje díky kmenovým buňkám umístěným ve střevních kryptách. Kmenové buňky produkují proliferační buňky, které v určitém bodě podléhají diferenciaci a vytvářejí nový střevní epitel. Většina genů podílejících se na tomto kroku je řízena vazbou PcGs. Během vývoje jsou tyto geny vazbou PcGs umlčeny a k jejich reaktivaci dochází až po jejich uvolnění. Následně se začínají produkovat transkripční faktory, které vedou k diferenciaci buněk. Během stárnutí podléhá subpopulace kmenových buněk metylacím *de novo* na cílových CpG ostrůvcích a vznikají malé oblasti tkáně s aberantním metylačním profilem. Tato modifikace vede k tvorbě konstitutivního heterochromatinu, který nelze jednoduše změnit. Takové kmenové buňky mohou sice odstranit z cílových diferenciacních genů PcGs, ale k reaktivaci jejich transkripce nedochází. Buňky se nepřeměňují na epitelální a zůstávají v proliferačním stavu. Tím vznikají příznivé podmínky pro maligní transformaci, ať už v důsledku genetické predispozice, nebo spontánní mutace. Tuto teorii podporují zjištění, že cílová místa jsou již částečně metylována u normálních buněk a silně modifi-

kována u raných prekancerózních stadií, tzv. polypů [47]. Během obnovy střevního epitelu z kmenových buněk umístěných v kryptách dochází k rychlým a častým přeměnám. Proto je metylační vzorec u normálních střevních buněk stejný jako u příslušných kmenových buněk. Methylace DNA u buněk jedné střevní krypty se zdají být uniformní, mezi jednotlivými kryptami se však liší. Předpokládá se, že jednotlivé CpG ostrůvky podléhají abnormální metylaci *de novo* zcela individuálně, některé jsou silně modifikovány, jiné zcela nemetylovány, ale u jiných tkání tomu může být naopak. To naznačuje, že v každé tkáni jsou přítomny buňky s nízkou hladinou metylace *de novo* a jiné buňky mají metylaci CpG ostrůvků vysokou. A pravděpodobně jsou to právě tyto buňky, které následně podléhají transformaci a získávají selekční výhodu. Podle této teorie metylace *de novo* existují již v subpopulaci normálních buněk ještě před jejich transformací podmíněnou genetickou mutací [51].

Malignity krvetvorby jsou dalším příkladem, jak změny v metylaci DNA přispívají k vývoji nádorů. Myelodysplastický syndrom nebo akutní myeloidní leukemie jsou onemocnění vyznačující se poruchou diferenciaci krevních buněk, jejichž riziko stoupá s věkem pacientů. Několik studií popisuje, že během stárnutí jak u myši, tak i u člověka se zvyšuje počet hematopoetických kmenových buněk, jejichž schopnost diferenciaci do lymfocytů je snížena a převládá myeloidní fenotyp. Bisulfitové studie celého genomu prokázaly, že tento proces je spojen se specifickými metylacemi *de novo* a demethylacemi standardně přítomnými u nádorů a je pravděpodobné, že tyto změny přispívající k obnově kmenových buněk a ztrátě diferenciaci jsou výsledkem přirozeného stárnutí bez přítomnosti genové mutace.

Závěr

V uplynulých letech došlo ke značnému pokroku v problematice nádorové epigenetiky. Velká část výzkumu byla věnována charakteristice epigenomu normálních a nádorových buněk s cílem definovat přesný buněčný původ nádoru a využití epigenetiky ke zlepšení

klasifikace jednotlivých podskupin nádorů. Nyní se pozornost obrací k objasnění funkcí jednotlivých epigenetických modifikací. V poslední době se pojmy genetika a epigenetika k sobě přibližují a ustupuje boj o to, která ze změn DNA je pro iniciaci a progresi nádorů důležitější. Naopak je zřejmé, že mutace a epigenetické změny DNA vzájemně „spolupracují“ na vzniku a vývoji tohoto onemocnění. Otvírají se další možnosti pro hledání biomarkerů a nových preventivních a terapeutických strategií. Cílem příštích let tedy bude zavedení DNA metylačních markerů do klinické diagnostiky a využití identifikovaných epigenetických terapeutických cílů pro léčbu nejen nádorových onemocnění.

Literatura

1. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3(6): 415–428. doi: 10.1038/nrg816.
2. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(4): 596–612. doi: 10.1007/s00018-008-8432-4.
3. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16(1): 6–21. doi: 10.1101/gad.947102.
4. Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem* 2011; 286(21): 18347–18353. doi: 10.1074/jbc.R110.205286.
5. Poh WJ, Wee CP, Gao Z. DNA Methyltransferase activity assays: advances and challenges. *Theranostics* 2016; 6(3): 369–391. doi: 10.7150/thno.13438.
6. Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 2008; 16(3): 341–350. doi: 10.1016/j.str.2008.01.004.
7. Buck-Koehntop BA, Defossez PA. On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics* 2013; 8(2): 131–137. doi: 10.4161/epi.23632.
8. Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF et al. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet* 2011; 44(1): 40–46. doi: 10.1038/ng.969.
9. Bjornsson HT, Fallin MD, Feinberg AP. An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet* 2004; 20(8): 350–358. doi: 10.1016/j.tig.2004.06.009.
10. Issa JP. Epigenetic variation and cellular Darwinism. *Nat Genet* 2011; 43(8): 724–726. doi: 10.1038/ng.897.
11. Hansen KD, Timp W, Bravo HC et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet* 2011; 43(8): 768–775. doi: 10.1038/ng.865.
12. Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC et al. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 1988; 48(5): 1159–1161.
13. Chan MF, van Amerongen R, Nijjar T et al. Reduced rates of gene loss, gene silencing, and gene mutation in Dnmt1-deficient embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21(22): 7587–7600. doi: 10.1128/MCB.21.22.7587-7600.2001.
14. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6): 1187–1197. doi: 10.1016/j.bcp.2004.04.030.

15. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9(16): 2395–2402.
16. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16(4): 168–174.
17. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21(2): 163–167. doi: 10.1038/5947.
18. Esteller M, Silva JM, Dominguez G et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(7): 564–569.
19. Esteller M, Avizienyte E, Corn PG et al. Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene* 2000; 19(1): 164–168. doi: 10.1038/sj.onc.1203227.
20. Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* 1998; 58(4): 591–593.
21. Esteller M, Fraga MF, Guo M et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001; 10(26): 3001–3007.
22. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128(4): 683–692. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.029.
23. Zhou C, Li J, Li Q. CDKN2A methylation in esophageal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8(30): 50071–50083. doi: 10.18632/oncotarget.18412.
24. Robaina MC, Faccion RS, Arruda VO et al. Quantitative analysis of CDKN2A methylation, mRNA, and p16(INK4a) protein expression in children and adolescents with Burkitt lymphoma: biological and clinical implications. *Leuk Res* 2015; 39(2): 248–256. doi: 10.1016/j.leukres.2014.11.023.
25. Jonsson A, Tuominen R, Grafstrom E et al. High frequency of p16(INK4A) promoter methylation in NRAS-mutated cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2010; 130(12): 2809–2817. doi: 10.1038/jid.2010.216.
26. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999; 59(4): 793–797.
27. Herman JG, Civin CI, Issa JP et al. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57(5): 837–841.
28. Wood LD, Parsons DW, Jones S et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; 318(5853): 1108–1113. doi: 10.1126/science.1145720.
29. Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H et al. GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* 2003; 23(23): 8429–8439.
30. Suzuki H, Toyota M, Carraway H et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer* 2008; 98(6): 1147–1156. doi: 10.1038/sj.bjc.6604259.
31. Nakagawa H, Nuovo GJ, Zervos EE et al. Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Res* 2001; 61(19): 6991–6995.
32. Esteller M, Rissques RA, Toyota M et al. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61(12): 4689–4692.
33. Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ et al. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 1978; 274(5673): 775–780.
34. Rideout WM3rd, Coetzee GA, Olumi AF et al. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 1990; 249(4974): 1288–1290.
35. Pfeifer GP, Tang M, Denissenko MF. Mutation hotspots and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 1–19.
36. Yoon JH, Smith LE, Feng Z et al. Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. *Cancer Res* 2001; 61(19): 7110–7117.
37. Fang M, Ou J, Hutchinson L et al. The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG island methylator phenotype. *Mol Cell* 2014; 55(6): 904–915. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.010.
38. Issa JP. Aging and epigenetic drift: a vicious cycle. *J Clin Invest* 2014; 124(1): 24–29. doi: 10.1172/JCI69735.
39. Raddatz G, Hagemann S, Aran D et al. Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the human epidermis. *Epigenetics Chromatin* 2013; 6(1): 36. doi: 10.1186/1756-8935-6-36.
40. Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S et al. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet* 2006; 38(2): 149–153. doi: 10.1038/ng1719.
41. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125(2): 315–326. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.041.
42. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 2007; 448(7153): 553–560. doi: 10.1038/nature06008.
43. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441(7091): 349–353. doi: 10.1038/nature04733.
44. Ohm JE, Baylin SB. Stem cell chromatin patterns: an instructive mechanism for DNA hypermethylation? *Cell Cycle* 2007; 6(9): 1040–1043. doi: 10.4161/cc.6.9.4210.
45. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009; 10(5): 295–304. doi: 10.1038/nrg2540.
46. Easwaran H, Johnstone SE, Van Neste L et al. A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. *Genome Res* 2012; 22(5): 837–849. doi: 10.1101/gr.131169.111.
47. Nejman D, Straussman R, Steinfield I et al. Molecular rules governing de novo methylation in cancer. *Cancer Res* 2014; 74(5): 1475–1483. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3042.
48. Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 2015; 347(6217): 78–81. doi: 10.1126/science.1260825.
49. Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell* 2014; 54(5): 716–727. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.015.
50. O'Hagan HM, Wang W, Sen S et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* 2011; 20(5): 606–619. doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.012.
51. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R et al. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res* 2016; 76(12): 3446–3450. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3278.

Úloha proteinu HSP70 v nádorech a jeho využití jako terapeutický cíl

The Role of HSP70 in Cancer and its Exploitation as a Therapeutic Target

Martinková V., Trčka F., Vojtěšek B., Müller P.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Vysoký proliferační potenciál a genetická nestabilita nádorových buněk je spojena se zvýšenou produkcí mutovaných a konformačně nestabilních proteinů. Nadměrná proteosyntéza spolu se zvýšeným metabolickým obratem vytvářejí stresové podmínky, které musí nádorová buňka trvale kompenzovat. Nádorové buňky se tak stávají závislé na udržování proteinové homeostázy zahrnující kontrolu kvality proteinů, jejich skládání, transport a stabilizaci. Tyto funkce jsou zajišťovány molekulárními chaperony, které jsou u nádorů reprezentovány především stresovými proteiny HSP70 a HSP90. Jejich exprese a aktivita je významně zvýšena ve všech maligních nádorech, kde spolu s dalšími proteiny nazývanými kochaperony vytváří multiproteinové komplexy. Aktivita HSP70 a HSP90 je nezbytná pro udržení maligního fenotypu tím, že se podílí na stabilizaci četných onkoproteinů, podporuje proliferaci a inhibuje apoptózu. V tomto ohledu představují proteiny teplotního šoku důležitý cíl využitelný v protinádorové terapii, neboť jejich inhibice umožňuje souběžnou inaktivaci řady signálních drah důležitých pro přežití nádorové buňky. Ačkoli bylo v uplynulém desetiletí vyvinuto několik specifických inhibitorů HSP90, jejich protinádorová aktivita je značně limitována vzhledem k indukci proteinů HSP70, které umožňují buňkám přežít. Vývoj inhibitorů HSP70 představuje novou výzvu v terapii cílené na inhibici proteostatických mechanismů nádorových buněk. **Cíl:** Cílem tohoto článku je shrnout informace o struktuře HSP70 a jeho roli při udržování proteinové homeostázy v normálních a nádorových buňkách. Článek popisuje mechanismy inhibice HSP70 pomocí nízkomolekulárních sloučenin a jejich potenciální aplikace v cílené protinádorové terapii.

Klíčová slova

HSP70 – stresové proteiny – molekulární chaperony – buněčný stres – nádory – skládání proteinu

Summary

Background: Sustained proliferation and genetic instability of cancer cells are associated with enhanced production of mutated and conformationally unstable proteins. Excessive proteosynthesis along with increased metabolic turnover generates stress conditions that cancer cells must permanently compensate for. Tumor cells thus become dependent on the maintenance of protein homeostasis, which involves protein quality control, folding, transport and stabilization. These tasks are provided by molecular chaperones, predominantly the stress proteins HSP70 and HSP90. Their expression and activity is increased in all malignant tumors, where they associate with their cochaperones to form large multiprotein complexes. HSP70 and HSP90 maintain the malignant phenotype because they facilitate the folding of numerous oncogenic proteins, maintain proliferative potential, and inhibit apoptosis. In this regard, heat-shock proteins represent an important target for cancer therapy because their inactivation results in the simultaneous blockade of multiple signaling pathways. Although several specific HSP90 inhibitors have been developed in the past decade, their antitumor activity as single agents is limited due to the induction of HSP70, which enables cell survival. Inhibitors of HSP70 thus present new possibilities for targeting proteostatic mechanisms in cancer cells. **Aim:** The aim of this article is to summarize information on the structure of HSP70 and its role in maintaining protein homeostasis in normal and cancer cells. The mechanisms of HSP70 inhibition by low-molecular weight compounds and their application in targeted antitumor therapy are also described.

Key words

HSP70 – stress proteins – molecular chaperons – cellular stress – tumours – protein folding

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Veronika Martinková
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: veronika.martinkova@mou.cz

Přijato/Accepted: 16. 08. 2018

doi: 10.14735/amko20182546

Úvod

Genetické změny a vysoký proliferační potenciál vedou u nádorových buněk ke zvýšené proteosyntéze a nadprodukcii konformačně nestabilních proteinů. Pro nádorové buňky je proto nezbytné aktivovat mechanismy udržující proteo-ovou homeostázu. Mezi základní mechanismy kontrolující kvalitu a množství proteinu v buňce patří ubiquitin-proteazomový systém, autofagie a molekulární chaperony. Zatímco první dva jmenované mechanismy slouží k degradaci proteinů, molekulární chaperony umožňují skládání a stabilizaci řady mutovaných proonkogenních proteinů nezbytných pro proliferaci nádorových buněk. V průběhu maligní transformace se tak nádorová buňka stává závislá na zvýšené

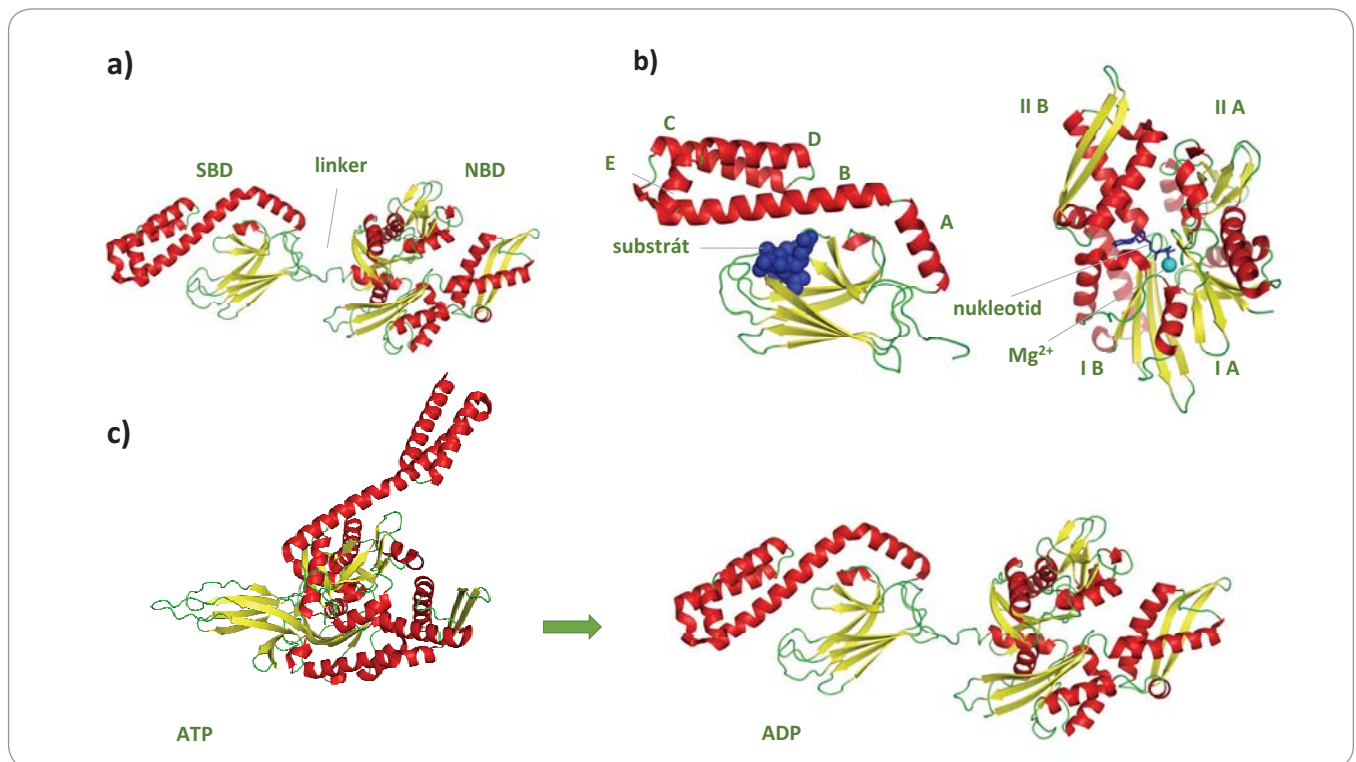
aktivitě molekulárních chaperonů. Mezi nejčastěji zastoupené chaperony patří stresové proteiny teplotního šoku (heat-shock proteins – HSPs) reprezentované několika proteinovými rodinami rozdělenými podle molekulové hmotnosti.

HSP70 tvoří rodinu sekvenčně konzervovaných molekulárních chaperonů s molekulovou hmotností 70 kDa [1]. V lidském genomu je tato rodina reprezentována minimálně 13 různými geny kódujícími strukturně a funkčně podobné proteiny, které dohromady tvoří až 2 % buněčného proteomu [2]. Mezi nejdůležitější konstitutivně exprimované izoformy patří HSPA8 v cytosolu a jádře, HSPA5 v endoplazmatickém retikulu a HSPA9 v mitochondriích. Expresí indukovaná stresem je pak charakteris-

tická pro HSPA1A a HSPA1B lokalizované v cytoplasmě i jádře [1]. Za fyziologických podmínek napomáhá HSP70 nově vznikajícím proteinům získat nativní konformaci. Dále je zapojen do vnitrobuněčného transportu proteinů, degradaci poškozených proteinů a asistuje při opětovném skládání chybně složených proteinů. Úloha HSP70 je nezastupitelná při stresových podmínkách (hypoxie, teplotní šok, UV záření apod.), které způsobují poškození konformace proteinů či jejich agregaci. HSP70 následně rozpoznává hydrofobní aminokyseliny poškozeného proteinu, na které se naváže, zabrání jeho agregaci a s využitím energie z hydrolyzy adenosintrifosfátu (adenosine triphosphate – ATP) umožňuje denaturovaným proteinům získávat na-

Tab. 1. Lidské proteiny patřící do rodiny HSP70.

Protein	UniProt ID	Alternativní názvy	Buněčná lokalizace	Počet aminokyselin	Expresí indukovaná stresem	Název genu	Genové ID
HSPA1A	P0DMV8	Hsp70-1, Hsp72, HspA1, Hsp70-1A, Hsp70i	cytosol, jádro, buněčná membrána, exozomy	641	ano	<i>HSPA1A</i>	3303
HSPA1B	P0DMV9	Hsp70-2, Hsp70-1B	cytosol, jádro, exozomy	641	ano	<i>HSPA1B</i>	3304
HSPA1L	P34931	Hsp70-1L, Hsp70-hom, Hsp70-1t, Hum70t	cytosol, jádro	641	ne	<i>HSPA1L</i>	3305
HSPA2	P54652	Heat-shock 70kD protein 2, Hsp70.2	cytosol, jádro, buněčná membrána, exozomy	639	ne	<i>HSPA2</i>	3306
HSPA5	P11021	Hsp70-5, BiP, Grp78, Mif-2	endoplazmatické retikulum, exozomy	654	ne	<i>HSPA5</i>	3309
HSPA6	P17066	Hsp70-6, Hsp70B'	cytosol, exozomy	643	ano	<i>HSPA6</i>	3310
HSPA7	P48741	Hsp70-7, Hsp70B	krevní mikročástice, exozomy	367	ano	<i>HSPA7</i>	3311
HSPA8	P11142	Hsp70-8, Hsc70, Hsc71, Hsp71, Hsp73	cytosol, jádro, buněčná membrána, exozomy	646	ne	<i>HSPA8</i>	3312
HSPA9	P38646	Hsp70-9, Grp75, HspA9B, MOT, MOT2, PBP74, mot-2, mtHsp70, mortalin	mitochondrie, jádro	679	ne	<i>HSPA9</i>	3313
HSPA12A	O43301	Hsp70-12A, FLJ13874, KIAA0417	exozomy	675	ne	<i>HSPA12A</i>	259217
HSPA12B	B7ZLP2	Hsp70-12B, RP23-32L15.1, 2700081N06Rik	endoteliální buňky, krevní plazma	685	ne	<i>HSPA12B</i>	116835
HSPA13	P48723	Hsp70-13, Stch	endoplazmatické retikulum, exozomy, mikrozoomy	471	ne	<i>HSPA13</i>	6782
HSPA14	Q0VDF9	Hsp70-14, Hsp70L1	cytosol, membrána	509	ano	<i>HSPA14</i>	51182



Obr. 1. Struktura HSP70.

Červeně jsou označeny α -helixy, žlutě struktury β -skládaného listu, zeleně nestrukturované oblasti a modře peptidový substrát, nukleotid a hořčnatý kationt. a) Na obrázku je znázorněna celá krystalová struktura HSP70 (PDB: 2KHO). Protein se skládá ze SBD a NBD, které navzájem spojuje linker. b) Detailní pohled na strukturu substrát vazebné domény nalevo (PDB: 1DKZ) a nukleotid vazebné domény napravo (PDB: 4B9Q). c) Schematické zobrazení výrazných strukturních změn v HSP70 po hydrolyze ATP. Nejvýraznější změny můžeme na první pohled pozorovat u SBD (PDB: 4JNE, 2KHO).

SBD – substrát vazebná doména, NBD – nukleotid vazebná doména, ATP – adenosin trifosfát, ADP – adenosin difosfát

tivní konformaci. Díky těmto funkcím je HSP70 zapojen do udržení proteinové homeostázy během fyziologických i stresových podmínek. Tuto rozsáhlou škálu funkcí však HSP70 nezastává samostatně. Proteiny, které se při těchto procesech s molekulárními chaperony asociují a napomáhají jejich funkci, jsou označovány jako kochaperony [3,4].

V tomto článku je skupina proteinů, které patří mezi HSPs 70, označována souhrnně jako HSP70 a pokud bylo v textu potřeba uvést konkrétní isoformu, je označena podle oficiálního názvu genu (tab. 1).

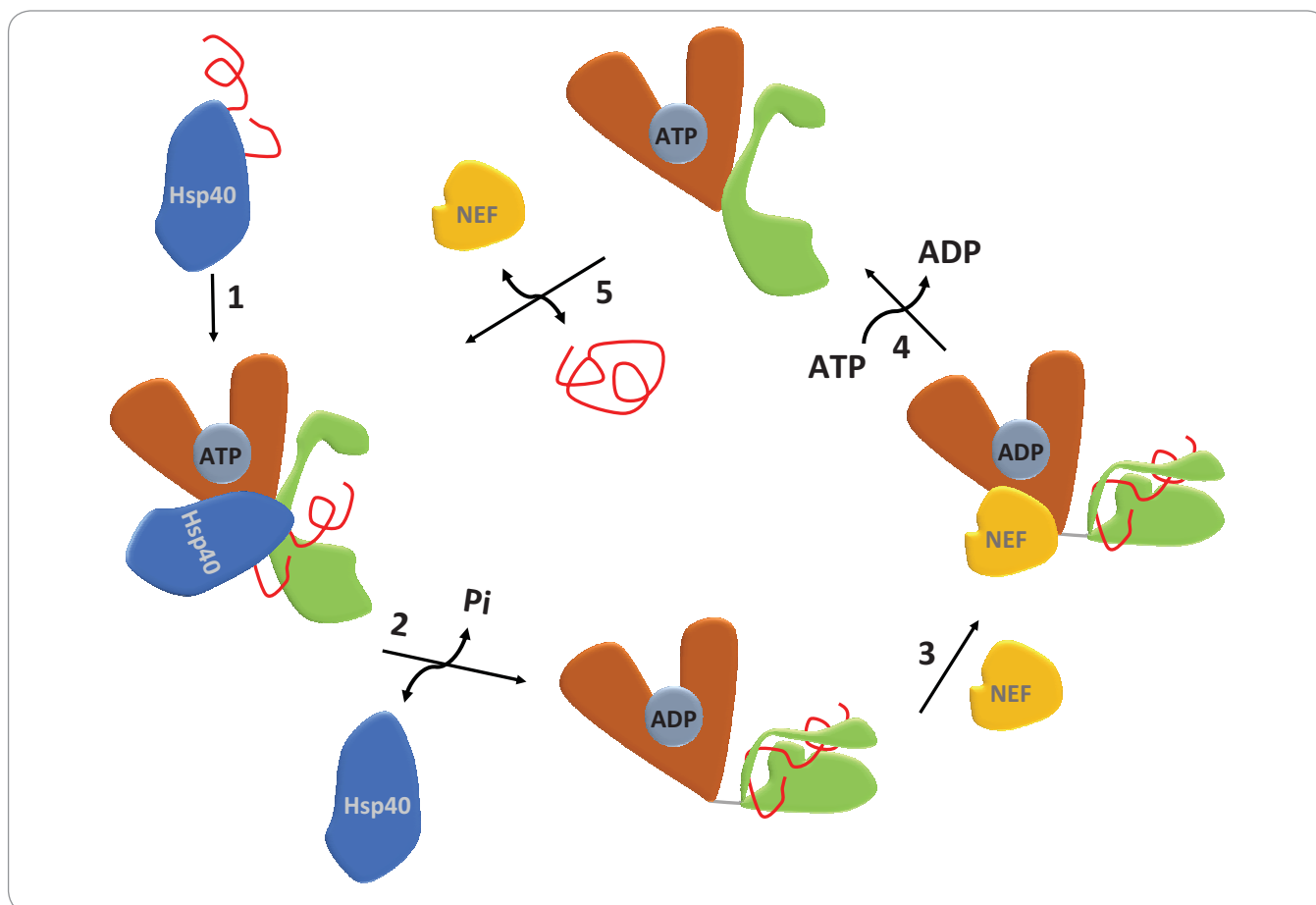
Struktura a ATPázový cyklus HSP70

Protein HSP70 je tvořen N-koncovou nukleotid vazebnou doménou (nucleotide-binding domain – NBD), 44 kDa a C-koncovou substrát vazebnou doménou (substrate-binding domain – SBD),

28 kDa (obr. 1a). NBD je dále členěna na subdomény IA/B a IIA/B, jejichž prostorové uspořádání vytváří kavitu pro vazbu ATP/adenosin difosfát (adenosine diphosphate ADP) v koordinaci s vazbou hořčnatého a draselného kationtu (obr. 1b) [5,6]. SBD se skládá ze dvou subdomén. Vlastní vazebné místo pro substrát je utvářeno v subdoméně se strukturou β -skládaného listu. Subdoména SBD tvořená soustavou α -helixů má pak funkci „víka“, které stabilizuje vazbu substrátu (obr. 1b). NBD a SBD domény jsou spojeny krátkou, vysoce konzervovanou hydrofobní sekvencí – linkerem (obr. 1a), který hraje významnou roli při regulaci alosterických strukturních změn v molekule HSP70 vyvolaných vazbou ATP [7].

V nepřítomnosti ATP se NBD a SBD domény HSP70 chovají jako nezávislé a SBD doména vykazuje vysokou afinitu k substrátu – vzniká tzv. uzavřená konformace

SBD (obr. 1c) [4]. Vazba ATP do NBD vede k částečnému splnutí („docking“) NBD a SBD domén regulované linkerovou sekvencí. Tím dochází ke snížení afinity substrátu k SBD, která se tak nachází v tzv. otevřené konformaci. Hydrolyza ATP na ADP uvádí molekulu HSP70 opět do stavu „uzavřené konformace“ SBD. Průchod proteinu HSP70 ATPázovým cyklem je usnadňován jeho interakcí s proteiny HSP40, které se váží na rozhraní NBD-SBD domén HSP70 v ATP-vázaném stavu, a spolu se substrátem, který transportují do SBD, katalyzují hydrolyzu ATP a vznik „uzavřené konformace“ SBD s navázaným substrátem (obr. 2). Spontánní uvolnění ADP z NBD je pomalý proces, který výrazně urychlují proteiny s funkcí NEF (nucleotide-exchange factor). Výměna ADP za ATP vede ke vzniku „otevřené konformace“ SBD a uvolnění substrátu, čímž se HSP70 navrácí na začátek ATPázového cyklu [8,9]. Typickými



Obr. 2. ATPázový cyklus HSP70.

1 – klientský protein je dopraven kochaperonem do SBD HSP70, 2 – vazba HSP40 způsobí rozsáhlé konformační změny, které způsobí hydrolyzu ATP a uzavření klientského proteinu v SBD, 3 – konformačními změnami dojde k odhalení vazebného místa pro NEF, 4 – vazbou NEF je umožněna výměna ADP za ATP, 5 – navázání ATP způsobí konformační změny vedoucí k uvolnění složeného klientského proteinu.

SBD – substrát vazebná doména, ATP – adenosin trifosfát, NEF – nukleotid výměnný faktor, ADP – adenosin difosfát

substráty HSP70 jsou krátké hydrofobní peptidové motivy obklopené pozitivně nabitými aminokyselinami, které jsou po denaturaci proteinů exponovány na jejich povrchu [10].

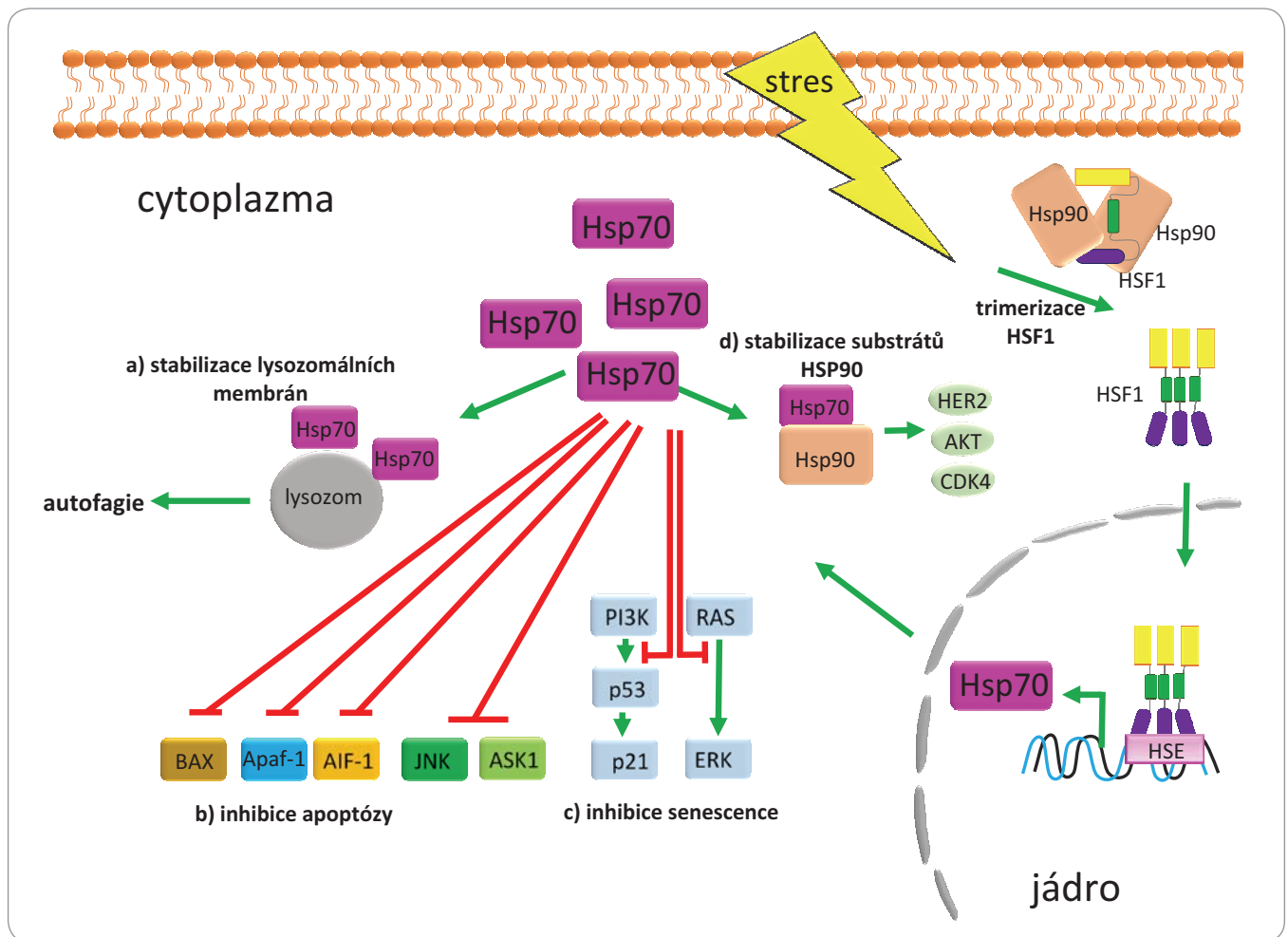
Regulace exprese HSP70

Přestože jsou proteiny HSP70 silně exprimovány ve všech buněčných typech, je jejich exprese významně zvyšována působením buněčného stresu. Zvýšení genové exprese HSP70 a dalších stresových proteinů je centrálním protektivním mechanismem kompenzujícím působení proteotoxického stresu u všech eukaryotických organismů. Klíčovou roli v regulaci genové exprese hraje evolučně konzervovaný transkripční faktor HSF1 (heat-shock factor) [11]. Tento transkripční program je označován jako

odpověď na tepelný šok (heat-shock response – HSR). Aktivita HSF1 vede ke zvýšené expresi některých molekulárních chaperonů, kochaperonů i dalších proteinů, které obsahují ve svých promotorech tzv. elementy tepelného šoku (heat-shock elementy – HSE). Jedná se o krátké sekvenční motivy DNA, na které se váže HSF1 [12]. Aktivita HSF1 je řízena jeho lokalizací a trimerizací. HSF1 je v nestresovaných buňkách přítomen v cytoplasmě jako monomer. Stresové podmínky vyvolávají trimerizaci HSF1 a jeho přesun do jádra, kde spouští expresi daných genů. Aktivita HSF1 je řízena zpětnou vazbou – spuštěním exprese HSE-regulovaných genů nastane rovněž zvýšení hladiny HSP90 a HSP70, jejichž přítomnost negativně ovlivňuje aktivaci HSF1 [13].

Úloha HSP70 v patologii nádorů

HSPA1A a HSPA1B patří mezi indukibilní izoformy HSP70, jejichž exprese je významně zvýšena u všech nádorů [14]. Ze souhrnných údajů o těchto indukibilních izoformách vyplývá, že tyto chaperony mohou hrát kauzální roli při zahájení maligní transformace. Konkrétně bylo zjištěno, že zvýšená exprese HSPA1A podporuje tumorigenicitu u buněk myšího fibrosarkomu a navozuje u nich rezistenci vůči cytotoxickému působení imunitních buněk [15]. Zvýšení exprese indukibilní izoformy HSP70 podporuje tvorbu T buněčného lymfomu u transgenních myší. U imortalizovaných fibroblastů Rat-1 bylo prokázáno, že nadměrná exprese HSPA1A způsobuje ztrátu kontaktní inhibice a vyvolává vznik nádorů při implantaci do myší. Naopak sni-



Obr. 3. Příklady proonkogenního působení HSP70.

Nádorové buňky jsou neustále vystavovány stresu (hypoxie, zánět, změna pH apod.), který aktivuje transkripční faktor HSF1 zodpovědný za zvýšenou expresi HSP70. Zvýšené množství proteinu HSP70 podporuje nádorovou transformaci na několika úrovních. a) Stabilizuje membrány lysozomů, čímž podporuje autofagii. b) Několika způsoby inhibuje vnější i vnitřní dráhu apoptózy. Zabraňuje translokaci BAX do mitochondrií, interakcí s APAF1 inhibuje vznik apoptozomu, zabraňuje kondenzaci chromatinu řízenou AIF-1 a inhibuje i děje řízené některými kinázami. c) Blokuje senescenci závislou i nezávislou na proteinu p53. d) Spolu s HSP90 se podílí na maturaci řady onkogenických proteinů vč. HER2, CDK4 a AKT.

žení exprese tohoto genu vede u těchto buněk ke ztrátě tumorigenních vlastností. Proonkogenní působení inducibilní HSP70 se uplatňuje rovněž v patogenezi nádorů prsu (breast cancer – BC). Bylo ukázáno, že zvýšení exprese HSPA1A je nezbytné pro maligní transformaci vyvolanou onkogenem HER2. Zvýšená exprese HSPA1A je charakteristická pro většinu maligních nádorů, u nichž koreluje s mírou dediferenciace (grade) a horší prognózou [16]. Nádorové buňky potřebují HSPA1A např. k inhibici apoptózy a senescence, ale i k posílení autofagie (obr. 3) [17]. HSPA1A potlačuje apoptózu inhibicí její vnitřní i vnější dráhy. U vnitřní dráhy je HSP70 vázán na BAX

(člen proapoptotické rodiny BCL-2), čímž zabraňuje jeho translokaci do mitochondrií [18]. Dalším mechanismem, kterým HSPA1A zabraňuje spuštění apoptózy, je inhibice proapoptotického proteinu APAF1 (apoptotic protease activating factor 1). HSPA1A se váže na APAF1 a zabraňuje tak jeho oligomerizaci, která je nutná pro tvorbu apoptozomu a aktivaci kaspázy 9 [19]. HSP70 rovněž inhibuje aktivaci vnější apoptotické dráhy vazbou k receptorům smrti. HSPA1A blokuje signalizaci zprostředkovanou apoptózou indukujícím ligandem patřícím do skupiny tumor nekrotizujícího faktoru (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand – TRAIL) tím, že tvoří kom-

plex s receptory DR4 a DR5 a znemožňuje tak tvorbu DISC (death-inducing signaling complex) u Bcr-Abl pozitivních buněk [20]. Programovanou buněčnou smrt závislou na kaspázách ovlivňuje HSPA1A interakcí s apoptózou indukujícím faktorem (AIF), čímž blokuje kondenzaci chromatinu řízenou AIF [21]. HSPA1A dále inhibuje i kaskádu dějů řízenou mitogenem aktivovanými proteinkinázami (mitogen-activated protein – MAP), vč. např. c-Jun [22]. Kromě inhibičního vlivu HSP70 na apoptózu byl dokumentován i jeho vliv na senescenci nádorových buněk. Bylo prokázáno, že vysoká exprese inducibilních izoform HSP70 je nutná pro zabránění

senescence v nádorových buňkách. Snížení exprese HSPA1A pomocí siRNA vedlo k navození senescence doprovázené aktivací nádorového supresorového proteinu p53 a zvýšenou expresí proteinu p21 [23]. Snížení exprese HSPA1A v nádorových buňkách může rovněž indukovat senescenci nezávislou na p53, a to díky schopnosti HSPA1A ovlivňovat signalizaci zprostředkovanou onkogenními kinázami PI3K, RAS a ERK [24]. Obdobné závěry vyplývají i z prací, které ukázaly, že inducibilní izoformy HSP70 jsou nezbytné pro nádorovou transformaci zprostředkovanou onkoproteinem HER2/neu a snížení jejich exprese vede k navození senescence [25].

Zvýšená exprese HSPA1A koreluje se zvýšenou proliferací nádoru, s klinickým stadiem a špatnou prognózou pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (non-small cell lung cancer – NSCLC) [26], BC, endometria [27], kolorektálním karcinomem [28], hepatocelulárním karcinomem [29] a karcinomem prostaty [30]. U pacientů s akutní myeloidní leukémií s charakteristickou expresí Bcr-Abl je zvýšená exprese HSPA1A spojována s rezistencí k imatinibu [31,32].

Plazmatická membrána nádorových buněk často obsahuje zvýšené množství HSPA1A [33]. Nádory s vysokým obsahem membránového HSPA1A jsou obecně vysoce rezistentní k chemoterapii a to často kvůli inhibici signálních drah JNK, ERK a NF- κ B [34]. U metastáz je hustota membránového HSPA1A vyšší v porovnání s primárním tumorem, což naznačuje schopnost membránového HSPA1A usnadnit proces metastazování. V souladu s těmito poznatky byla vyšší hustota membránového HSPA1A spojena s nepříznivou prognózou a sníženým celkovým přežitím pacientů s rektálním karcinomem a spinocelulárním karcinomem plic [35,36].

Kromě cytoprotektivních účinků se změněná exprese nebo funkce HSPA1A podílí také na vývoji dalších onemocnění, která jsou spojena s defekty v konformaci či skládání proteinů. Mezi tato onemocnění patří např. Parkinsonova a Alzheimerova choroba [4].

Inhibice HSP70

V současnosti jsou neustále vyvíjeny nové strategie pro úspěšnou léčbu ma-

ligních onemocnění. Základním konceptem úspěšné chemoterapie je narušení procesu, který je pro nádorovou buňku klíčový. Podobně jako genotoxické látky využívají u nádorů zvýšený metabolismus nukleových kyselin, můžeme zvýšenou proteosyntézu a přítomnost nestabilních proteinů v nádorových buňkách využít k cílené protinádorové léčbě. Dosavadní vývoj protinádorové terapie založené na narušení proteinové homeostázy se soustředil zejména na vývoj nízkomolekulárních látek inhibujících proteazom a stresový protein HSP90. Ačkoli bylo v uplynulém desetiletí vyvinuto několik specifických inhibitorů HSP90, jejich protinádorová aktivita je značně limitována kvůli indukci proteinů HSP70, které zabraňují navození buněčné smrti a umožňují buňkám přežít. Syntéza selektivních inhibitorů HSP70 tak představuje novou výzvu v terapii cílené na inhibici proteostatických mechanismů nádorových buněk [37–39].

Vhodným mechanismem účinku inhibitorů HSP70 je jejich vazba do substrát a nukleotid vazebné domény a také narušení protein-proteinových interakcí mezi HSP70 a jeho kochaperony [40]. Doposud bylo nalezeno několik inhibitorů, u nichž byla potvrzena jejich vazba do struktury HSP70 (tab. 2). Míra aktivity inhibitorů a síla vazby látek k HSP70 byla charakterizována pomocí inhibiční konstanty IC_{50} (koncentrace inhibitoru, při které dojde ke snížení odpovědi na 50 %), střední efektivní koncentrace EC_{50} (koncentrace látky, při které nastane snížení definované odpovědi na polovinu) nebo disociační konstanty K_d (síla vazby mezi inhibitorem a HSP70) (tab. 2).

MKT-077 a jeho deriváty

Jedním z prvních nalezených inhibitorů HSP70 je kladně nabitě rhodacyaninové barvivo MKT-077, které se váže poblíž vazebného místa pro ATP v nukleotid vazebné doméně mitochondriálního HSPA9. Za selektivitu MKT-077 je zodpovědná i jeho kationtová povaha, díky čemuž je akumulován protonovým gradientem v mitochondriích rychle se dělících nádorových buněk [41,54]. Později byla také pomocí spektroskopie nukleární magnetické rezonance potvrzena vazba mezi MKT-077 a HSPA8. Inhibitor je zde

vázán do negativně nabitě kapsy v blízkosti nukleotid vazebného místa. Díky jeho selektivní vazbě pouze do ADP stavu HSPA8 začal být MKT-077 klasifikován jako alosterický inhibitor [54]. Jeho protinádorový efekt byl pozorován např. u inhibice proliferace nádorových buněčných linií prsu, střeva a močového měchýře ($IC_{50} \sim 1-5 \mu\text{m}$) a zároveň nebyla pozorována toxicita u zdravých buněk ledvin [41]. Inhibitor MKT-077 postoupil do fáze I klinických testů, v níž byly pacientům aplikovány každodenně infuze o dávce 30–50 mg/m² po dobu 3 týdnů. U řady pacientů však byla pozorována renální toxicita a zároveň bylo zjištěno, že dochází k rychlé metabolizaci MKT-077, čímž nemohlo být v séru dosaženo požadované terapeutické hladiny [55].

Nestabilita MKT-077 je způsobena především oxidací benzothiazolového a pyridinového kruhu. Lepší stability za současného udržení dobré antiproliferační aktivity bylo dosaženo systematickými substitucemi, přičemž nejlepší výsledky vykazovala látka se zaměněným pyridinovým kruhem za thiazolový heterocyklus se současnými substitucemi malých molekul (na benzothiazolovém a thiazolovém kruhu). Aplikací vzniklé látky JG-98 na buňky prsního adenokarcinomu MDA-MB-231 byly zjištěny $EC_{50} = 0,4 \mu\text{m}$ a $> 7\times$ lepší mikrozomální stabilita – 37 min. Později byl JG-98 identifikován jako alosterický inhibitor interakce HSP70/BAG3 [42,56].

Novolactone

Haasan et al hledali dráhy a konkrétní geny, které ovlivňuje přírodní látka novolactone prostřednictvím screeningu přežívání heterozygotických a homozygotických delečních mutantů kvasinek vystavených této látce. Při bližším zkoumání biochemických vlastností kvasinkového i lidského HSP70 po jejich ovlivnění novolactonem bylo objeveno, že se jedná o alosterický inhibitor, který se kovalentně váže na Glu444 v SBD HSPA1A. Studium chování HSPA1A inhibovaného novolactonem přineslo nové poznatky o alosterické komunikaci NBD a SBD domén [43]. Zmíněný inhibitor je proto užitečným nástrojem pro pochopení fungování chaperonů *in vitro* i *in vivo* a v neposlední řadě také novým potenciálním léčivem.

Tab. 2. Látky modulující aktivitu HSP70.

Látka	Vazebné místo	Známa struktura HSP70 inhibitor	Míra aktivity/vazby [μm]	Reference
rhodocyaniny a analoga				
MKT-077	NBD	Ano ^d (NMR)	1,4 (EC ₅₀)	[41,42]
JG-98	NBD		0,4 (EC ₅₀)	[42]
novolactone	SBD	Ano ^b (RTG)	0,25 (IC ₅₀)	[43]
flavonoidy				
EGCG	NBD		12 (IC ₅₀); 0,7 ^c (K _d)	[44]
myricetin	NBD	Ano ^a (NMR)	14,5 (IC ₅₀)	[45]
látky mimikující ATP				
VER-155008	NBD	Ano ^d (RTG)	0,5 (IC ₅₀); 0,3 ^b (K _d)	[46]
fenylehtylsulfonamidy				
PES	SBD		8,4 (IC ₅₀); 6 ^b (K _d)	[47,48]
PET-16	SBD	Ano ^a (RTG)	1,5 (IC ₅₀); 4 ^b (K _d)	[48]
deriváty kolchicinu				
AEAC	neznámé		100 (IC ₅₀); 0,15 ^b (K _d)	[49]
imidazoly				
apoptozol	NBD		0,21 ^d (K _d); 0,14 ^b (K _d)	[50]
peptidy				
peptidový aptamer A8	SBD			[51]
peptidový aptamer A17	NBD			[51]
polyaminy				
15-deoxyspergualin	SBD		4 ^d (K _d)	[52]
dihydropyrimidiny				
MAL3-101	NBD		8,3 ^d (IC ₅₀)	[53]
vakcíny				
pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70 DNA				(NCT00121173)
rekombinantní protein HSP70				(NCT00030303)
HSP70-peptid TKD/IL-2 aktivovaný				(NCT02118415)
protilátka cmHSP70.1	epitop TKD			(NCT02118415)
CN54gp140 glycoprotein- HSP70 konjugovaná vakcína				(NCT01285141)

NMR – spektroskopie nukleární magnetické rezonance, EGCG – epigalokatechin galát, ATP – adenosintrifosfát, SBD – substrát vazebná doména, NBD – nukleotid vazebná doména, TKD – peptid o aminokyselinové sekvenci: TKDNNLLGRFELSG

^adnaK, ^bHSPA1, ^cHSPA5, ^dHSPA8

Inhibitory s flavonoidní strukturou

Epigalokatechin galát (epigallocatechin gallate – EGCG) je přírodní polyfenolický flavonoid ze zeleného čaje, u něhož byla pomocí afinitní chromatografie zjištěna interakce s NBD endoplazmatic-

kého HSPA5 (K_d = 0,7 μm) [44]. Dalším inhibitorem s flavonoidní strukturou je myricetin, který taktéž inhibuje ATPázovou aktivitu HSP70. Detailnější mechanismus jeho účinku byl popsán u bakteriálního HSP70 – DnaK. Myricetin inhibuje interakci DnaK s kochaperonem

DnaJ (HSP40), čímž blokuje ATPázový cyklus DnaK [45].

Látky mimikující ATP

Williamson et al v roce 2009 s využitím krystalové struktury komplexu ATP a HSPA8/BAG1 navrhli a připravili sérii

8- a 8,5'-substituovaných derivátů adenozinu. Následnými systematickými modifikacemi těchto inhibitorů v poloze C8 a 5' bylo dosaženo hodnoty $IC_{50} = 0,5 \mu\text{m}$ u látky, která dostala název VER-155008. Krystalová struktura komplexu VER-155008-HSPA8 odhalila stabilizaci inhibitoru v NBD HSPA8 prostřednictvím několika π - π interakcí mezi Arg272, aromatickými kruhy obou substituentů a Tyr15 [46]. Doposud byla u této látky prokázána inhibice proliferace nádorových linií prsu a střeva s GI_{50} v rozmezí 5,3–14,4 μm . U linie BT474 (BC) VER-155008 indukuje kaspázami-3/7 závislou apoptózu, kdežto u linie HCT116 (karcinom střeva) způsobuje apoptózu nezávislou na systému kaspáz-3/7 [57].

2-phenylethynylsulfonamid

Nízkomolekulární látka 2-phenylethynylsulfonamid (PES) (známá též pod názvem pfithtrin- μ) zabraňovala akumulaci p53 v mitochondriích, nebyly však známy jeho přímé intracelulární cíle. Prostřednictvím biotinylovaného PES a afinitní precipitace byl jako intracelulární cíl tohoto inhibitoru nalezen HSPA1A. Vazebné místo pro PES bylo pomocí deleční mutagenese identifikováno v substrát vazebné doméně HSP70 [47]. PES vykazuje cytotoxicitu vůči širokému spektru solidních nádorů bez ohledu na jejich status p53 a zvýšenou expresi antiapoptotického Bcl-xL. PES způsobuje poškození procesu degradace makromolekul pomocí autofagie a lyzozomů, což vede k nahromadění nesprávně složených a agregovaných proteinů, vč. substrátů HSP90 a následně k buněčné smrti [58].

AEAC

AEAC je syntetický derivát kolchicinu inhibující HSPA1A. Bližší charakterizace mechanismu účinku prokázala inhibici vazby substrátu a poškození HSP70-řízeného refoldingu. Prozatím existují na základě *in silico* predikcí tři potenciální místa vazby inhibitoru AEAC – jedno v NBD a dvě v SBD. Ačkoliv byla naměřena nanomolární afinita mezi AEAC a HSPA1A *in vitro* a *in silico*, nebyl pozorován výrazný vliv podání AEAC na viabilitu nádorových buněk krysího glioblastomu (C6) a melanomu (B16). Současné podání AEAC a doxorubicinu však sig-

nifkantně zesílilo protinádorový efekt doxorubicinu [49].

Apoptozol

Apoptozol byl nalezen při screeningu knihovny imidazolových látek s apoptotickým účinkem. Při bližším zkoumání bylo zjištěno, že se specificky váže do NBD HSPA1A a HSPA8 [50,59]. Mechanismus účinku tohoto inhibitoru spočívá v přerušení interakce mezi HSP70 a jeho substrátem APAF1. Tato událost vede k aktivaci buněčné smrti závislé na kaspázách. Využití apoptozolu k potenciální protinádorové terapii podporuje studie na myších xenograftech, u nichž bylo pozorováno zmenšení nádoru bez vlivu na viabilitu myši [59].

Využití HSP70 v imunoterapii

Kromě nízkomolekulárních látek inhibujících HSP70 jsou v posledních letech také intenzivně studovány imunogenní vlastnosti chaperonů. V personalizované medicíně hledají své uplatnění komplexy HSP70-substrátový peptid izolované z nádorů konkrétního pacienta i lidský rekombinantní protein HSPA1A [60–62]. Ke zdolání nádorů pomocí imunitní odpovědi však existuje mnohem víc způsobů: a) imunizace komplexem HSP70-HPV16 oE7 antigenem vede k aktivaci imunitní odpovědi řízené CD8+ buňkami; b) exozomy z nádorových buněk nadměrně produkující HSP70 aktivují zránění dendritických buněk a odpověď řízenou buňkami CD4+ a CD8+ a c) komplexy HSP70 s tumor asociovanými antigeny izolované z fúzních dendritických a nádorových buněk způsobují odpověď řízenou T lymfocyty doprovázenou indukci efektorových i paměťových T buněk [60,63,64].

V současnosti probíhá několik klinických testů sledujících imunogenní vlastnosti HSP70. V prvním klinickém testu byla hledána míra odpovědi imunitního systému pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v chronické fázi na vakcínu vyrobenou z jejich vlastního nádoru. Vakcína byla připravena z přečištěného HSPA1A a na základě výsledků byla reinfúze autologních NK (natural killer) buněk aktivovaných HSPA1A shledána za bezpečnou [65]. Díky úspěšným testům z fáze I, probíhá v kombinaci

s chemoradioterapií fáze II u pacientů s NSCLC (NCT02118415). Odlišná vakcína pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70 DNA byla testována u pacientek s cervikální intraepiteliální neoplazií [66]. Ve fázi I klinického testování je také sledován rekombinantní protein HSP70 při léčbě CML v chronické fázi (NCT00030303).

Závěr

Zvýšení genetické nestability a proliferační aktivity nádorových buněk klade velké nároky na buněčný proteostatický aparát, jehož centrální složkou jsou molekulární chaperony HSP90 a HSP70. Úspěšné zavedení inhibice HSP90 do nádorové terapie je komplikováno komplexností buněčného chaperonového systému, který na inhibici HSP90 reaguje zvýšením exprese chaperonů rodiny HSP70. Objevení či design selektivního inhibitoru HSP70 s vysokou afinitou a jeho kombinované použití s inhibitory HSP90 představuje nadějnou strategii při léčbě nádorových onemocnění. Klíčové je zejména zacílení na stresem-indukovanou izoformu HSPA1A, jejíž zvýšená exprese je charakteristická pro nádorové buňky.

Literatura

1. Daugaard M, Rohde M and Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007; 581(19): 3702–3710. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.039.
2. Zyllicz M and Wawrzynow A. Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life* 2001; 51(5): 283–287. doi: 10.1080/152165401317190770.
3. Durech M, Vojtěšek B and Müller P. The many roles of molecular chaperones and co-chaperones in tumor biology. *Klin Onkol* 2012; 25 (Suppl 2): 45–49.
4. Mayer MP and Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(6): 670–684. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6.
5. Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. 3-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 1990; 346(6285): 623–628. doi: 10.1038/346623a0.
6. Kityk R, Kopp J, Sinning I et al. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Mol Cell* 2012; 48(6): 863–874. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.023.
7. Aprile FA, Dhulesia A, Stengel F et al. Hsp70 oligomerization is mediated by an interaction between the interdomain linker and the substrate-binding domain. *PLoS One* 2013; 8(6): e67961. doi: 10.1371/journal.pone.0067961.
8. Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci* 2013; 38(10): 507–514. doi: 10.1016/j.tibs.2013.08.001.
9. Kampinga HH and Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(8): 579–592. doi: 10.1038/nrm2941.
10. Rüdiger S, Germeroth L, Schneider-Mergener J et al. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined

- by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J* 1997; 16(7): 1501–1507. doi: 10.1093/emboj/16.7.1501.
11. Powers MV, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett* 2007; 581(19): 3758–3769. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.040.
 12. Shi YH, Mosser DD, Morimoto RI et al. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Gene Dev* 1998; 12(5): 654–666.
 13. Zheng X, Krakowiak J, Patel N et al. Dynamic control of Hsf1 during heat shock by a chaperone switch and phosphorylation. *Elife* 2016; 5: e18638. doi: 10.7554/eLife.18638.
 14. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR et al. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor-cells. *Int J Cancer* 1992; 51(4): 613–619.
 15. Jaattela M. Over-expression of Hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer* 1995; 60(5): 689–693.
 16. Sherman MY and Gabai VL. Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene* 2015; 34(32): 4153–4161. doi: 10.1038/onc.2014.349.
 17. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* 2013; 34(6): 1181–1188. doi: 10.1093/carcin/bgt111.
 18. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP et al. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 2005; 280(46): 38729–38739. doi: 10.1074/jbc.M509497200.
 19. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L et al. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000; 2(8): 476–483. doi: 10.1038/35019510.
 20. Guo F, Siqua C, Bali P et al. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* 2005; 105(3): 1246–1255. doi: 10.1182/blood-2004-05-2041.
 21. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3(9): 839–843. doi: 10.1038/ncb0901-839.
 22. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD et al. Hsp70 prevents activation of stress kinases – A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 1997; 272(29): 18033–18037.
 23. Yaglom JA, Gabai VL and Sherman MY. High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res* 2007; 67(5): 2373–2381. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3796.
 24. Gabai VL, Yaglom JA, Waldman T et al. Heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence pathways in cancer cells. *Mol Cell Biol* 2009; 29(2): 559–569. doi: 10.1128/MCB.01041-08.
 25. Meng L, Hunt C, Yaglom JA et al. Heat shock protein Hsp72 plays an essential role in Her2-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene* 2011; 30(25): 2836–2845. doi: 10.1038/onc.2011.5.
 26. Malusecka E, Zborek A, Krzyzowska-Gruca S et al. Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP27 in primary non-small cell lung carcinomas. An immunohistochemical study. *Anticancer Res* 2001; 21(2A): 1015–1021.
 27. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperon* 2005; 10(2): 86–103.
 28. Hwang TS, Han HS, Choi HK et al. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J Gastroen Hepatol* 2003; 18(6): 690–700.
 29. Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K et al. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: Identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37(1): 198–207. doi: 10.1053/jhep.2003.50022.
 30. Kurahashi T, Miyake H, Hara I et al. Expression of major heat shock proteins in prostate cancer: Correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *J Urology* 2007; 177(2): 757–761. doi: 10.1016/j.juro.2006.09.073.
 31. Thomas X, Campos L, Mounier C et al. Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia Res* 2005; 29(9): 1049–1058. doi: 10.1016/j.leukres.2005.02.010.
 32. Ray S, Lu Y, Kaufmann SH et al. Genomic mechanisms of p210(BCR-ABL) signaling - Induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(34): 35604–35615. doi: 10.1074/jbc.M401851200.
 33. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M et al. A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (Hsp72) is expressed on the surface of human tumor-cells, but not on normal-cells. *Int J Cancer* 1995; 61(2): 272–279.
 34. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G et al. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21(1): 93–101. doi: 10.1038/sj.leu.2404463.
 35. Juhasz K, Lipp AM, Nimmervoll B et al. The complex function of Hsp70 in metastatic cancer. *Cancers* 2014; 6(1): 42–66. doi: 10.3390/cancers6010042.
 36. Pfister K, Radons J, Busch R et al. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype – association with different routes of metastasis. *Cancer* 2007; 110(4): 926–935. doi: 10.1002/cncr.22864.
 37. Guo F, Rocha K, Bali P et al. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy, to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res* 2005; 65(22): 10536–10544. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1799.
 38. Grossin L, Etienne S, Gaborit N et al. Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo. *Biorheology* 2004; 41(3–4): 521–534.
 39. Sadekova S, Lehnert S, Chow TY. Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radioat Biol* 1997; 72(6): 653–660.
 40. Massey AJ. ATPases as drug targets: Insights from heat shock proteins 70 and 90. *J Med Chem* 2010; 53(20): 7280–7286. doi: 10.1021/jm100342z.
 41. Koya K, Li Y, Wang H et al. MKT-077, a novel rhodocyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer Res* 1996; 56(3): 538–543.
 42. Li XK, Srinivasan SR, Connarn J et al. Analogues of the allosteric heat shock protein 70 (Hsp70) inhibitor, MKT-077, as anti-cancer agents. *ACS Med Chem Lett* 2013; 4(11): 1042–1047. doi: 10.1021/ml400204n.
 43. Hassan AQ, Kirby CA, Zhou W et al. The Novolactone natural product disrupts the allosteric regulation of Hsp70. *Chem Biol* 2015; 22(1): 87–97. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.11.007.
 44. Ermakova SP, Kang BS, Choi BY et al. (–)-epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* 2006; 66(18): 9260–9269. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1586.
 45. Chang L, Miyata Y, Ung PM et al. Chemical screens against a reconstituted multiprotein complex: Myricetin blocks DnaJ regulation of DnaK through an allosteric mechanism. *Chem Biol* 2011; 18(2): 210–221. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.12.010.
 46. Williamson DS, Borgognoni J, Clay A et al. Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa Heat Shock Protein, discovered through structure-based design. *J Med Chem* 2009; 52(6): 1510–1513. doi: 10.1021/jm801627a.
 47. Leu JI, Pimkina J, Frank A et al. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell* 2009; 36(1): 15–27. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.023.
 48. Leu JI, Zhang P, Murphy ME et al. Structural basis for the inhibition of HSP70 and DnaK chaperones by small-molecule targeting of a C-terminal allosteric pocket. *ACS Chem Biol* 2014; 9(11): 2508–2516. doi: 10.1021/cb500236y.
 49. Lazarev VF, Sverchinsky DV, Mikhaylova ER et al. Sensitizing tumor cells to conventional drugs: HSP70 chaperone inhibitors, their selection and application in cancer models. *Cell Death Dis* 2018; 9(2): 41–52. doi: 10.1038/s41419-017-0160-y.
 50. Williams DR, Ko SK, Park S et al. An apoptosis-inducing small molecule that binds to heat shock protein 70. *Angew Chem Int Edit* 2008; 47(39): 7466–7469. doi: 10.1002/anie.200802801.
 51. Rerole AL, Gobbo J, De Thonel A et al. Peptides and aptamers targeting HSP70: A novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer Res* 2011; 71(2): 484–495. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1443.
 52. Nadler SG, Tepper MA, Schacter B et al. Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with member of the Hsp70 family of heat-shock proteins. *Science* 1992; 258(5081): 484–486.
 53. Fowell SW, Day BW and Brodsky JL. Identification of an inhibitor of hsc70-mediated protein translocation and ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 2001; 276(2): 910–914. doi: 10.1074/jbc.M008535200.
 54. Rousaki A, Miyata Y, Jinwal UK et al. Allosteric drugs: the interaction of antitumor compound MKT-077 with human Hsp70 chaperones. *J Mol Biol* 2011; 411(3): 614–632. doi: 10.1016/j.jmb.2011.06.003.
 55. Propper DJ, Braybrooke JP, Taylor DJ et al. Phase I trial of the selective mitochondrial toxin MKT 077 in chemotherapy-resistant solid tumours. *Ann Oncol* 1999; 10(8): 923–927.
 56. Li XK, Colvin T, Rauch JN et al. Validation of the Hsp70-Bag3 protein-protein interaction as a potential therapeutic target in cancer. *Mol Cancer Ther* 2015; 14(3): 642–648. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0650.
 57. Massey AJ, Williamson DS, Browne H et al. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemoth Pharm* 2010; 66(3): 535–545. doi: 10.1007/s00280-009-1194-3.
 58. Leu JI, Pimkina J, Pandey P et al. HSP70 Inhibition by the small-molecule 2-phenylethanesulfonamide impairs protein clearance pathways in tumor cells. *Mol Cancer Res* 2011; 9(7): 936–947. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0019.
 59. Ko SK, Kim J, Na DC et al. A small molecule inhibitor of ATPase activity of HSP70 induces apoptosis and has antitumor activities. *Chem Biol* 2015; 22(3): 391–403. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.02.004.
 60. Enomoto Y, Bharti A, Khaleque AA et al. Enhanced immunogenicity of heat shock protein 70 peptide complexes from dendritic cell-tumor fusion cells. *J Immunol* 2006; 177(9): 5946–5955.
 61. Guzhova IV and Margulis BA. HSP70-based anti-cancer immunotherapy. *Hum Vacc Immunother* 2016; 12(10): 2529–2535.
 62. McNulty S, Colaco CA, Blandford LE et al. Heat-shock proteins as dendritic cell-targeting vaccines - getting warmer. *Immunology* 2013; 139(4): 407–415. doi: 10.1111/imm.12104.
 63. Zong JB, Wang C, Liu B et al. Human hsp70 and HPV16 oE7 fusion protein vaccine induces an effective antitumor efficacy. *Oncol Rep* 2013; 30(1): 407–412. doi: 10.3892/or.2013.2445.
 64. Xie YF, Bai O, Zhang H et al. Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8(+) CTL- and NK-mediated antitumor immunity than exosomes released from heat-shocked tumour cells expressing cytoplasmic HSP70. *J Cell Mol Med* 2010; 14(11): 2655–2666. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00851.x.
 65. Krause SW, Gastpar R, Andreesen R et al. Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin Cancer Res* 2004; 10(11): 3699–3707. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0683.
 66. Trimble CL, Peng S, Kos F et al. A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. *Clin Cancer Res* 2009; 15(1): 361–367. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1725.

Úloha proteínu HSF1 v nádorovej transformácii

The Role of HSF1 Protein in Malignant Transformation

Šimončík O., Pastorek M., Vojtěšek B., Müller P.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Súhrn

Východiská: Transkripčný faktor HSF1 je esenciálny regulátor stresovej odpovede, ktorá slúži k rýchlej adaptácii organizmov na nepriaznivé podmienky, akými sú napr. zvýšená teplota alebo oxidatívny stres. HSF1 reguluje expresiu veľkého množstva génov primárne kódujúcich proteíny tepelného šoku (heat shock proteins – HSPs). Ide prevažne o molekulárne chaperóny, ktoré umožňujú udržiavať natívnu konformáciu proteínov, zabraňujú ich degradácii a podieľajú sa na odstraňovaní denaturovaných proteínov. K základným predstaviteľom molekulárnych chaperónov patria proteíny HSP70 a HSP90. Stresová odpoveď je vysoko konzervovaná u všetkých eukaryotických organizmov. HSF1 je ako hlavný regulátor tejto odpovede zapojený do množstva fyziologických procesov (ribozómová biogenéza, translácia, transkripcia, bunkový cyklus, metabolizmus) a patologických stavov (neurodegeneratívne poruchy, akými sú napr. Parkinsonova alebo Alzheimerova choroba). Zvýšená expresia HSF1 bola pozorovaná v rozvinutých štádiách ľudských nádorov (karcinóm prostaty, prsníka, kolorektálny karcinóm aj.), v ktorých koreluje s ich agresivitou a zlou prognózou pre pacienta. HSF1 ovplyvňuje množstvo procesov zapojených v karcinogéze, a preto predstavuje významný diagnostický a prognostický marker. Dnes je predmetom výskumu pre potenciálnu protinádorovú terapiu. V súčasnosti je známych niekoľko inhibítorov HSF1, u ktorých zostáva objasniť molekulárne mechanizmy ich pôsobenia, potvrdiť špecifitu k HSF1, netoxicitu v zdravých tkanivách a ich účinnosť v zabíjaní cieľových nádorových buniek. **Cieľ:** Tento prehľadový článok sa zameriava na transkripčný faktor HSF1, zhrňuje základné mechanizmy jeho regulácie a aktivácie, úlohu HSF1 počas malígne transformácie a možné protinádorové využitie nízkomolekulárnych inhibítorov HSF1 aktivity.

Kľúčové slová

HSF1 transkripčný faktor – molekulárne chaperóny – bunkový stres – transformácia nádorov – rakovina

Summary

Background: The heat shock transcription factor, HSF1, is the main regulator of the proteotoxic stress response that orchestrates the adaptation of cells to stress conditions such as elevated temperature, oxidative stress, and proteotoxic stress. As such, HSF1 regulates a large number of stress response-related genes, primarily those encoding heat shock proteins (HSPs). HSPs are molecular chaperones involved in the acquisition of native protein conformations and the prevention of protein degradation, and they also contribute to the removal of denatured proteins via the proteasome. Representative members of the HSP family are HSP70 and HSP90. The stress response is a highly conserved mechanism across all eukaryotes, and HSF1 has been linked to a number of physiological processes (ribosomal biogenesis, translation, transcription, cell cycle, and metabolism) and pathological disorders (neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases). HSF1 activation is also prominent in different types of cancer (prostate, breast, colorectal carcinoma etc.) where it correlates with tumor aggressiveness and poor prognosis. HSF1 is therefore considered a diagnostic and prognostic marker and is currently being targeted to develop new cancer therapies. Several inhibitors of HSF1 have already been synthesized, but their molecular mechanism(s) of action, specificity those of HSF1, nontoxicity in healthy tissues, and their efficacy in targeting tumor cells remain to be elucidated. **Purpose:** This review summarizes known mechanisms of HSF1 regulation and activation, the role of HSF1 during malignant transformation, and the potential of designing small molecule HSF1 inhibitors for cancer therapy.

Key words

HSF1 transcription factor – molecular chaperones – cellular stress – tumor transformation – cancer

Práca bola podporená projektom MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklaruji, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Oliver Šimončík

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: oliver.simoncik@mou.cz

Přijato/Accepted: 10. 8. 2018

doi: 10.14735/amko20182555

Úvod

Objav transkripčného faktora HSF1 predchádzali pozorovania zmeny štruktúry chromozómov a zvýšená expresia špecifických proteínov po vystavení bunky stresovým podmienkam. Taliansky genetik Feruccio Ritossa v roku 1962 publikoval, že v podmienkach zvýšenej teploty alebo vplyvom Dinitrofenolu (Dinitrophenol – DNP) dochádza u *Drosophily* k rozvoľneniu niektorých špecifických oblastí chomozómov [1]. Pozorovanie rozvoľnenia štruktúry, pripisované transkripčne aktívnym miestam, viedlo k identifikácii proteínov tepelného šoku (heat shock proteins – HSPs). Prvá zmienka o zvýšenej syntéze týchto proteínov po vystavení buniek *Drosophily* stresovým podmienkam vyvolaným tepelným šokom bola publikovaná v roku 1974 [2]. Odvtedy zaznamenal výskum stresovej odpovede významný posun. Bolo odhalené, že mnohé HSPs slúžia ako molekulárne chaperóny, ktoré umožňujú udržiavať natívnu konformáciu proteínov, zabraňujú ich degradácii a podieľajú sa na odstraňovaní denaturovaných proteínov v podmienkach proteotoxického stresu [3]. Všeobecne sa o nich dá povedať, že sa svojou aktivitou podieľajú na udržiavaní proteínovej homeostázy (proteostázy), a sú preto pre život eukaryotických organizmov nevyhnutné.

Expresia génov *HSPs* je regulovaná vysoko konzervovanou skupinou transkripčných faktorov tepelného šoku (heat shock transcription factors – HSFs). U *Saccharomyces cerevisiae* a *Drosophila melanogaster* bol charakterizovaný je-

diný, esenciálny HSF [4]. U stavovcov bolo popísaných niekoľko HSFs (HSF1-5, HSFY a HSFX) a niekoľko ďalších bolo popísaných u rastlín [5]. U väčšiny organizmov sú *HSF* gény exprimované konštitutívne, a preto sa vyvinulo množstvo mechanizmov, ktoré regulujú aktivitu HSF na úrovni proteínu [5].

HSF1

HSF1 je hlavný regulátor odpovede tepelného šoku. Úlohu transkripčného regulátora sprostredkováva cez väzbu na tzv. elementy tepelného šoku (heat shock element – HSE) – konzervované úseky promótorov cieľových génov [6]. HSF1 je známy ako transkripčný aktivátor chaperónov a ko-chaperónov, ktorý zohráva dôležitú úlohu v základných fyziologických procesoch, akými sú regulácia energetického metabolizmu, bunkovej delenie alebo starnutie [7]. So zníženou expresiou HSF1 sú spojené niektoré patofyziologické deje, medzi ktoré patria neurodegeneratívne poruchy, ako napr. Parkinsonova a Alzheimerova choroba [8]. Na druhej strane, pokročilé štádiá rozličných typov nádorov sú spojené s jeho zvýšenou expresiou [9].

Štruktúra a aktivácia HSF1

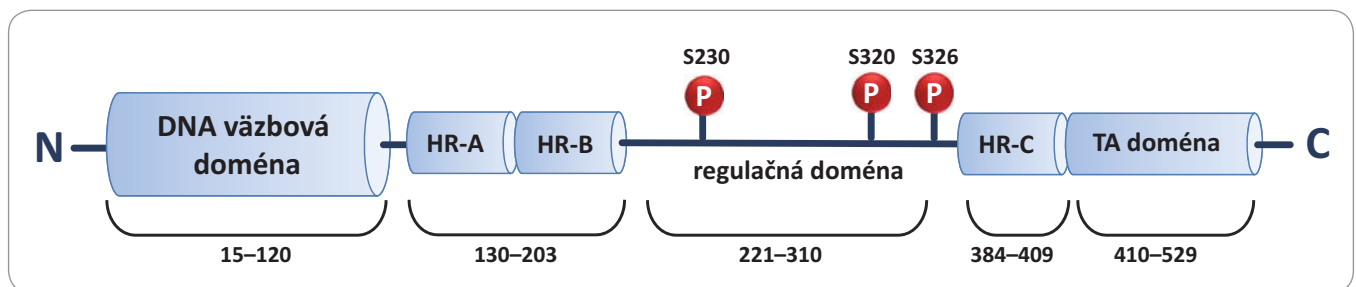
K pochopeniu mechanizmov aktivácie HSF1 na molekulárnej úrovni je nevyhnutné detailné poznanie jeho štruktúry. HSF1 sa skladá z niekoľkých funkčných domén, ktoré sú naprieč eukaryotickými druhmi vysoko konzervované. Ľudský proteín HSF1 je usporiadaný do 4 funkčných domén s celkovou dĺžkou 529 aminokyselín (obr. 1). Na N-konci sa

nachádza DNA väzbová doména (DNA-binding domain – DBD) [10], ktorá je zodpovedná za stabilizáciu oligomérskej štruktúry HSF1 a za väzbu na promótor cieľových génov. Za DBD sa nachádza trimerizačná doména, ktorá obsahuje krátke hydrofóbne opakovania (hydrophobic repeat – HR-A/B) majúce funkciu tzv. leucínového zipsu. Nasledujúce domény zahŕňajúce regulačnú doménu (RD), krátky hydrofóbny úsek (HR-C) a C-koncovú transaktivačnú doménu (TAD) sú cieľom pre kinázy/fosfatázy, ktoré kontrolujú úroveň aktivácie HSF1 prostredníctvom posttranslačných modifikácií (PTM) [11].

Komplexnosť stresovej odpovede dotvárajú okrem PTM aj iné regulačné mechanizmy. V bazálnych podmienkach nestresovaných buniek sa HSF1 nachádza v jadre a cytoplazme v neaktívnej monomérskej konformácii v interakcii so chaperónovými komplexmi HSP70 a HSP90. V tomto stave vykazuje HSF1 nízku afinitu k cieľovým úsekom DNA. Po vystavení proteotoxickému stresu HSF1 formuje trimér prostredníctvom HR-A a HR-B domén, ktorý sa akumuluje v jadre, kde sa následne viaže na HSE motívy v promótoroch cieľových génov [11,12] (obr. 2).

HSF1 je priamy senzor stresu, ktorý reaguje na rôzne stresové podmienky rozvoľnením monomérskej konformácie a formovaním stabilnej trimérskej konformácie. Otázkou dodnes zostáva mechanizmus brániaci spontánnej trimerizácii HSF1. Existujú tri modely, ktoré môžu byť za túto represiu zodpovedné.

Prvý model predstavuje intramolekulárna interakcia medzi hydrofóbnymi



Obr. 1. Štruktúra HSF1. HSF1 je proteín zložený zo 4 funkčných domén – DNA väzbová doména, trimerizačná doména, regulačná doména a transaktivačná doména. Dĺžka ľudského HSF1 je 529 aminokyselín. P (S230, S320, S326) znázorňujú 3 najlepšie popísané fosforylácie, spojené s aktiváciou HSF1.

HSF1 – transkripčný faktor tepelného šoku 1, P – fosforylácia, HR – hydrofóbne opakovania, TA doména – transaktivačná doména

oblasťami HR-A/B a HR-C. Vystavením buniek zvýšenej teplote dochádza k rozvoľneniu tejto štruktúry, a tým aj k uľahčeniu prechodu HSF1 do energetickejšieho stavu (trimérna konformácia). Tento mechanizmus bol podporený prácou popisujúcou purifikovaný rekombinantný proteín HSF1 ako priamy senzor zvýšenej teploty [13]. Práca však nevysvetľuje mechanizmus jeho priamej aktivácie pri odlišných typoch stresu.

Ďalší možný mechanizmus predstavuje väzba HSF1 s molekulárnymi chaperónmi, ktoré stabilizujú monomérnu konformáciu. Vplyvom HSP90 inhibítorov alebo iného proteotoxického stresu dochádza k disociácii HSF1 z komplexu molekulárných chaperónov, k jeho trimerizácii a následnej aktivácii [14]. Po uplynutí stresu vedie zvýšená hladina voľných chaperónov k spätnoväzbovej inaktivácii HSF1 [15–17].

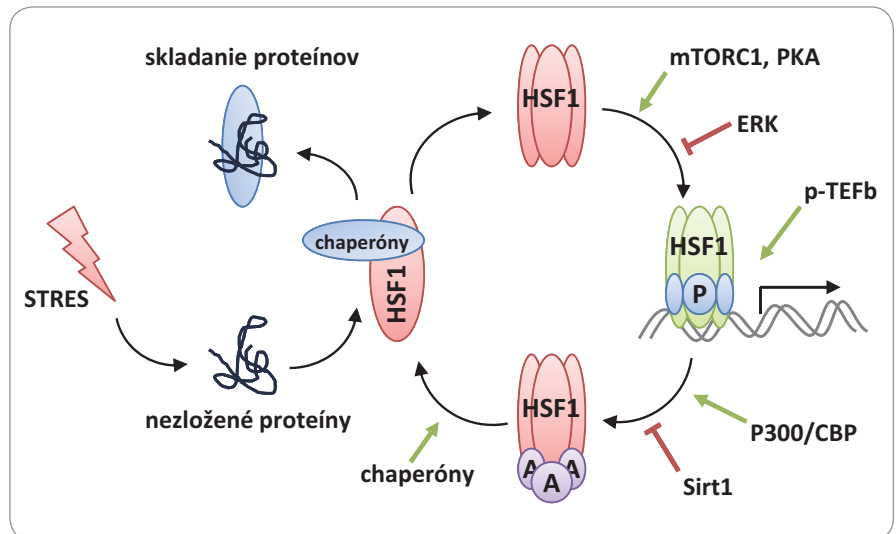
V bezstresových podmienkach predstavuje HSF1 monomérny fosfoproteín, ktorý je fosforylovaný na niekoľkých serínových zvyškoch [18]. PTM preto môžu prezentovať ďalší mechanizmus schopný ovplyvňovať úroveň aktivácie HSF1 v odlišných stresových podmienkach.

Väzba na DNA

Trimér HSF1 sa viaže na konzervované, kanonické oblasti HSE, ktoré sa nachádzajú v promótoroch veľkého množstva génov asociovaných so stresom. Štruktúra HSE sa môže mierne líšiť medzi jednotlivými génmi. HSE oblasti predstavujú invertované repetície s nGAAn sekvenciou (nTTCn|nGAAn|nTTCn|nGAAn), kde „n“ predstavuje ľubovoľný nukleotid. Každá DNA väzbová doména trimérneho HSF1 rozpoznáva jednu nGAAn sekvenciu, pričom tri striedavo orientované DBD domény sú nevyhnutné pre stabilnú väzbu HSF1 na DNA [7].

Posttranslačné modifikácie

Tvorba trimérnej konformácie, ktorá umožňuje DNA väzbovú aktivitu nezabezpečuje úplnú transkripčnú aktivitu. HSF1 preto podlieha PTM, ktoré zahŕňajú fosforylácie, acetylácie a sumoylácie. Medzi najlepšie preskúmané fosforylácie patria fosforylácie serínových zvyš-



Obr. 2. Aktivačno-utlmujúci cyklus HSF1. Pod vplyvom proteotoxického stresu dochádza k nesprávnemu skladaniu proteínov, ktoré súperia s HSF1 o väzbu molekulárných chaperónov. Po disociácii chaperónových komplexov podlieha HSF1 trimerizácii, ktorá umožňuje DNA väzbovú aktivitu. Prostredníctvom aktivačných fosforylácií (mTORC1, PKA) dochádza k úplnej aktivácii HSF1. Pre iniciáciu transkripcie sú nevyhnutné ďalšie ko-aktivátory, akým je napr. p-TEFb. Po utlmení stresu je HSF1 acetylovaný (p300/CBP), stráca DNA väzbovú aktivitu a plynulo prechádza do monomérnej konformácie, ktorá je stabilizovaná väzbou chaperónových komplexov.

A – acetylácia, P – fosforylácia, HSF1 – transkripčný faktor tepelného šoku 1, mTORC1 – mTOR komplex 1, Sirt1 – Sirtuín 1

kov S121 (MK2) [19], S303 (GSK3) [20], S307 (ERK) [21] a S363 (PKC) [22], ktoré potláčajú aktivitu HSF1 a fosforylácie S230 (CaMKII) [23], S320 (PKA) [24] a S326 (mTORC1) [25], ktoré naopak podporujú transaktivačnú kapacitu HSF1. Ďalšie PTM, akými sú acetylácia a sumoylácia, sa podieľajú po uplynutí stresu na miere a dĺžke stresovej odpovede [26] (obr. 2).

Génová regulácia

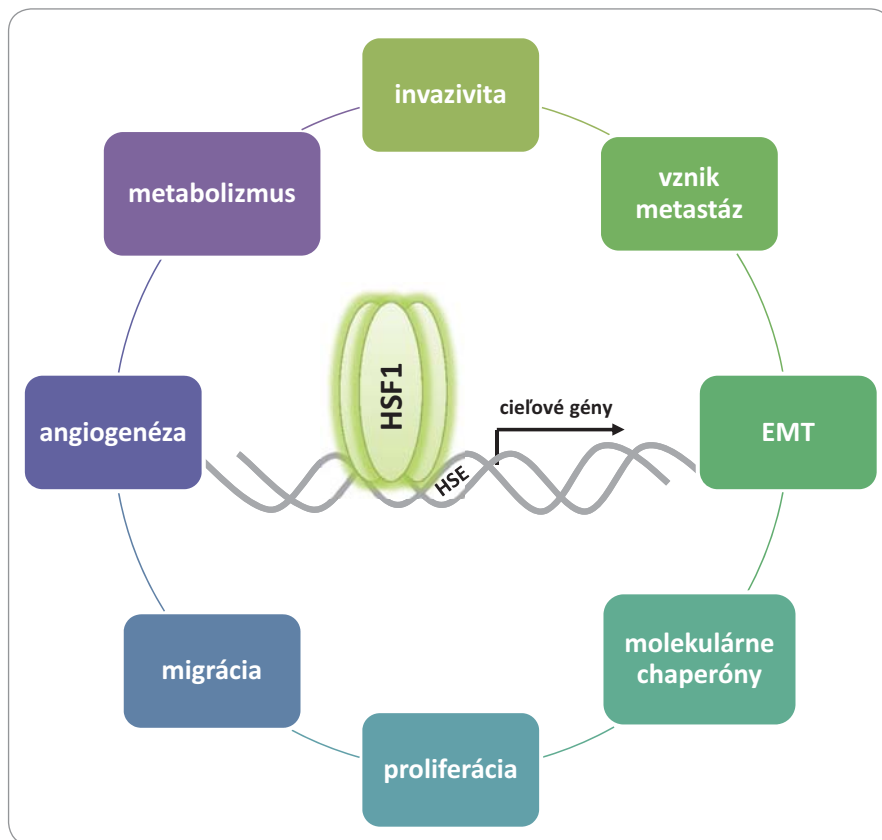
Dôležitou charakteristikou stresovej odpovede je rýchlosť, akou bunka dokáže odpovedať na vzniknuté podnety prostredníctvom zvýšenej expície adaptačných proteínov. Aktivácia HSF1 musí preto predstavovať veľmi rýchly proces. Aktivovaný HSF1 je lokalizovaný na cieľových promótoroch už niekoľko sekúnd po tepelnom šoku. Promótory génov HSPs sú prispôbené k rýchlej aktivácii tým, že obsahujú neaktívnu RNA polymerázu II, ktorá sa nachádza približne 20 bp od počiatku transkripcie [27]. Vzájomná interakcia HSF1 s pozitívnym transkripčným elongačným faktorom 1 (p-TEFb) umožňuje naviazanie

p-TEFb na cieľové promótory a p-TEFb následne sprostredkováva fosforyláciu C-koncového domény RNA polymerázy II spojenú s aktiváciou, a tým spoločne s HSF1 zahajuje transkripciu [28].

Úloha HSF1 počas malígne transformácie

Proteínová homeostáza je v nádorových bunkách často narušená dysregulovanou proteosyntézou, nerovnováhou proteínov spôsobenou aneuploidiou a nadmernou expresiou onkogénov.

To, že malígna transformácia je proces silno asociovaný s proteotoxickým stresom, podporujú pozorovania zvýšenej aktivity HSF1 u rozličných typov ľudských nádorov, akými sú napr. nádory prostaty [29], prsníka (breast cancer – BC) [30], kolorektálny karcinóm (colorectal carcinoma – CRC) [31], orálny skvamózny karcinóm [17] alebo hepatocelulárny karcinóm [32]. Zvýšená hladina HSF1 koreluje s agresivitou onkologického ochorenia, pozitívne ovplyvňuje invazivitu a rozvoj metastáz a je spojená so zlou prognózou pre pacienta [33]. Dôležitosť HSF1 v procese karcinogenézy pod-



Obr. 3. Prehľad významných úloh HSF1 počas karcinogenézy. HSF1 reguluje expresiu HSPs, energetický metabolizmus a množstvo signálnych dráh. Reguláciou procesov, akými sú proliferácia, EMT, nádorová angiogenéza, invazivita, migrácia a tvorba metastáz zohráva dôležitú úlohu počas malígnej transformácie.

HSF1 – transkripčný faktor tepelného šoku 1, EMT – epiteliálno-mezenchymálna tranzícia, HSE – elementy tepelného šoku

poruje znížené riziko tvorby nádorov u HSF1 deficientných myší, ktorých rast bol indukovaný mutáciou p53, onkoproteínom Ras alebo chemickými mutagénmi [33]. V ľudských nádorových líniiach vedie utíšenie HSF1 k zníženej proliferácii a k zníženému prežívaniu bunkových kultúr [33]. Prvým vysvetlením tohoto fenoménu bolo, že HSF1 podporuje malignitu prostredníctvom expície proteínov HSPs. Štúdie zamerané na interakcie HSF1 s chromatínom však ukázali, že HSF1 riadi počas malígnej transformácie odlišnú skupinu génov ako počas stresovej odpovede [9]. Aj napriek výraznej podpore karcinogenézy však HSF1 nepredstavuje klasický onkoproteín, pretože v ľudských nádoroch neboli pozorované žiadne somatické mutácie *HSF1* a ani nadmerná expresia HSF1 nevedla k malígnej transformácii, ako je to

v prípade iných onkoproteínov, akým je napr. Ras [33]. HSF1 podporuje karcinogenézu tým, že sa zúčastňuje na fyziologických procesoch, na ktorých sa stali nádorové bunky závislé.

HSF1 a HSPs

HSPs predstavujú skupinu molekulárnych chaperónov umožňujúcich udržiavať proteínovú homeostázu počas stresových podmienok [34]. Niektoré podtypy BC, nádorov prostaty či hrubého čreva sú spojené so zvýšenou expresiou týchto chaperónov, predovšetkým však HSP27, HSP70 a HSP90 [31,35]. Hoci za ich expresiu zodpovedá primárne HSF1, nie vždy bola pozorovaná asociácia medzi zvýšenou expresiou HSPs a HSF1. Podporuje to hypotézu, že HSF1 nespúšťa v nádorových bunkách klasickú stresovú odpoveď, ale regu-

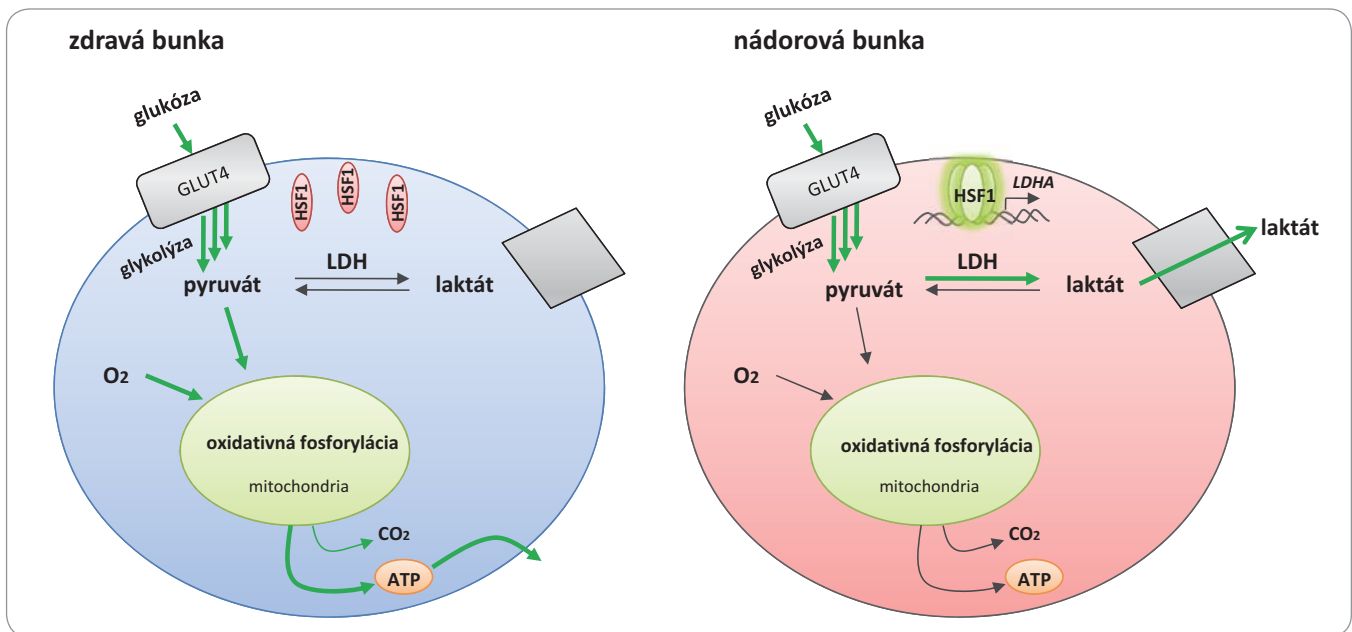
luje expresiu iba niektorých špecifických HSPs a to v závislosti od typu a štádia ochorenia [9]. Napríklad u agresívnych HER2+ nádorov prsníka je knock-out HSF1 spojený so zníženou expresiou HSP27 a HSP70. U HER2+ myší viedol následne knock-out HSF1 k zníženej karcinogenéze prsníka, ako aj k zníženému výskytu pľúcnych metastáz [36,37]. Jednou z možností protinádorového efektu delécie HSF1 je práve znížená expresia týchto chaperónov. Keďže množstvo klientských proteínov HSPs predstavujú silné onkoproteíny, ich stabilizácia pomocou chaperónov je pre nádorové bunky nesmierne dôležitá. Okrem toho zvýšená proliferácia nádorových buniek spojená so zvýšenou produkciou proteínov kladie vysoké nároky na mechanizmy kontrolujúce kvalitu proteínov. HSPs hrajú preto v týchto procesoch nezastupiteľnú úlohu závislú na aktivite HSF1.

Jedným z klientov HSP70 je napr. proapoptický proteín p53. HSP70 interaguje s mutovaným p53 rovnako dobre ako s wild type p53 [38]. V prípade mutácie chaperón HSP70 stabilizuje mutovaný p53 a tým umožňuje propagáciu jeho onkogénnych vlastností.

Ďalším dôležitým chaperónom so zvýšenou expresiou u mnohých typov ľudských nádorov je HSP27. Zvýšená hladina HSP27 často koreluje s rezistenciou k chemoterapeutikám a so zlou prognózou [39]. HSP27 sa podieľa na regulácii prestavby aktínových filamentov počas bunkového pohybu. HSF1 tak môže prostredníctvom indukcie expície a fosforylácie HSP27 podporovať migráciu a invazivitu nádorových buniek [32].

Tretím dôležitým chaperónom, ktorý sa zúčastňuje nádorovej transformácie, je HSP90. Jeho expresia je rovnako ako u predchádzajúcich chaperónov regulovaná aktivitou HSF1. HSP90 pri procese karcinogenézy stabilizuje viacero onkogénnych klientov, akými sú proteínkináza B (PKB), inhibičný faktor migrácie makrofágov (MIF) alebo samotný HSF1 [35].

V CRC bola hladina mRNA pre HSF1 zvýšená u 86 % pacientov. Zvýšená hladina HSF1 v CRC koreluje so zvýšenou expresiou chaperónov HSP27 a HSP90 a ko-chaperónu BAG-3.



Obr. 4. Metabolizmus glukózy v zdravých a nádorových bunkách. Nádorové bunky sú závislé na aeróbnej glykolýze (Warburgov efekt) [64]. Zvýšená hladina HSF1 v nádorových bunkách indukuje syntézu laktát dehydrogenázy, ktorá katalyzuje premenu pyruvátu na laktát [67].

HSF1 – transkripčný faktor tepelného šoku 1, LDH – laktátdehydrogenáza, ATP – adenosíntrifosfát

BAG-3 stabilizuje hladinu anti-apoptických členov rodiny Bcl-2 a tým umožňuje bunkám CRC prežiť aj v pro-apoptických podmienkach [40].

HSF1 a signálne dráhy

Vznik nádora, epiteliálno-mezenchymálna tranzícia (EMT), zvýšená migrácia a invazivita, výskyt metastáz alebo vznik rezistencie k apoptóze sú následkom mutácií, ktoré vedú k deregulácii signálnych dráh a metabolizmu bunky. HSF1 zohráva centrálnu úlohu v množstve signálnych dráh, ktoré sa zúčastňujú týchto procesov (obr. 3).

p53 a Ras

Tumor supresor *TP53* a onkogén *Ras* sú dva najčastejšie mutované gény v ľudských nádoroch. V modelových myších organizmoch s mutáciou p53 bol pozorovaný zvýšený výskyt lymfómov, pričom simultánna delécia HSF1 a p53 viedla k poklesu tvorby lymfómov [33]. Dai et al ukázali, že delécia HSF1 dramaticky znižuje tvorbu nádorov u myší nesúcich dominantne negatívnu mutáciu génu *Tp53*. Naproti tomu, HSF1^{+/+} a HSF1^{+/-} myši nesúce dominantne negatívnu mutáciu génu *Tp53* mali vyvinuté široké spek-

trum nádorov, zahŕňajúcich lymfómy, sarkómy aj karcinómy. Poukazuje to na významnú úlohu HSF1 pri p53 indukovanvej karcinogéze, ktorá bola potvrdená aj pri ďalších onkogénoch. Proteíny Ras ako aj PDGF-B sú silné mitogénne transduktory, ktorých aktivita vedie k nadmernému deleniu buniek. Myšie embryonálne fibroblasty (MEFs) s deléciou HSF1 však dokážu odolávať Ras-mediovaným mitogénnym signálom [33].

HSF1 a HIF-1

Jedným z možných následkov nadmernej proliferácie neoplázií je vznik nedostatočne vaskularizovaných hypoxických oblastí charakteristických zníženou hladinou kyslíka v nádorovom tkanive. Kľúčovým regulátorom hypoxickej odpovede je transkripčný faktor HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), ktorý po vytvorení heterokomplexu pozostávajúceho z podjednotiek HIF-1 α a HIF-1 β reguluje expresiu cieľových génov cez väzbu na špecifické responzivné elementy (hypoxia response element – HRE) sekvencie v DNA [41]. Adaptácia na hypoxiu je však okrem aktivácie HIF-1 α podmienená viacerými faktormi všeobecne asociovanými so stresovou odpoveďou, akými

sú napr. aktivácia dráhy opravujúcej poškodenie DNA, alebo antioxidačnej odpovede [42–44]. U viacerých eukaryotických organizmov bola počas hypoxie pozorovaná aj výrazne zvýšená expresia HSPs, ktorých expresia nebola spájaná s reguláciou HIF-1 [45,46], avšak sa ukázala ako dôležitá pre prežívanie v podmienkach so zníženou hladinou kyslíka. To poukazuje na dôležitosť aktívacie HSF1 signálnej dráhy počas hypoxickej odpovede [47,48]. Naopak Baird et al na modeli *Drosophily melanogaster* pozorovali po knock-oute HIF-1 výrazne zníženú expresiu HSPs spojenú s nižším prežívaním po vystavení hypoxii a reoxygénácii. Tieto pozorovania naznačujú, že HIF-1 signálna dráha by mohla regulovať aj expresiu HSPs, ktoré sú zapojené do fyziologickej odpovede na stres spôsobený nedostatkom kyslíka [49]. Na druhej strane bolo popísané, že chaperónová aktivita HSP70 a HSP90 je potrebná pre stabilizáciu HIF-1, a je teda kritická pre adaptáciu na hypoxiu a oxidatívny stres [50,51]. Môže teda aktivita HSF1 nepriamo regulovať hypoxickú signálnu dráhu cez expresiu HSPs stabilizujúcich HIF-1? Na myšom modeli progenitorových buniek kostnej drene

spôsobil knock-out HSF1 nedostatočnú mieru angiogenézy asociovanú s utlmením HIF-1 signálnej dráhy [52]. Prepojenie medzi signálnymi dráhami regulovanými transkripčnými faktormi HIF-1 a HSF1 je z hľadiska protinádorovej terapie zaujímavým, avšak nie úplne objasneným fenoménom, ktorý si zasluhuje ďalšie skúmanie.

HSF1 a PI3K-AKT-mTOR

Receptor HER2 je okrem nádorov vaječníkov a žalúdka asociovaný hlavne so zvýšenou agresivitou ľudského BC [37,53]. Nadmerná expresia HER2 spôsobuje jeho spontánnu, na ligande nezávislú dimerizáciu, ktorá vedie k aktivácii signálnej dráhy PI3K/AKT [54]. Dráha PI3K-AKT-mTOR (mammalian target of rapamycin) je zapojená do regulácie rastu, prežívania a apoptózy a je často deregulovaná v ľudských nádoroch [55–57]. V HER2+ nádoroch prsníka je mTOR zodpovedný za konštitutívnu fosforyláciu HSF1 na S326, expresiu HSPs a stabilizáciu HSP90 klientov, akými sú napr. MIF, AKT, mutovaný p53 alebo samotný HSF1, ktoré podporujú rast HER2+ nádorových buniek [25,35]. V prítomnosti metabolického stresu AMP-aktivovaná proteínkináza (AMPK) dokáže potláčať aktivitu komplexu mTORC1 [58]. Týmto sa metabolický stres podieľa nepriamo na inaktivácii HSF1. EMT je bunkový proces podporujúci tvorbu metastáz [59]. Jedným z hlavných iniciátorov EMT je regulačný faktor Slug [60]. Prostredníctvom signalizácie HER2-PI3K-AKT-mTOR aktivovaný HSF1 je schopný indukovať expresiu proteínu Slug, podporovať EMT a podieľať sa na zvyšovaní malignity HER2+ nádorov [61].

HSF1 a energetický metabolizmus

Aby nádorové bunky splňali zvýšené nároky na rast a proliferáciu, je u nich výrazne zosilnený príjem živín, najmä glukózy [62]. Zdravé bunky sa spoliehajú primárne na mitochondriálnu oxidatívnu fosforyláciu na generovanie energie potrebnej pre bunkové procesy. Naproti tomu nádorové bunky často využívajú aeróbnu glykolýzu. Tento jav sa nazýva „Warburgov efekt“ a je pre nádorové bunky charakteristický [62,63].

Tie metabolizujú glukózu za vzniku pyruvátu, ktorý je však prostredníctvom zvýšenej katalytickej aktivity laktátdehydrogenázy A (LDH-A) redukovaný na laktát, a to aj v prítomnosti kyslíka (obr. 4). V porovnaní s oxidatívnou fosforyláciou ide o energeticky nevýhodný proces, a preto nádorové bunky zvyšujú príjem glukózy a stávajú sa „závislé na cukre“. Nádorové bunky majú tiež zvýšenú aktivitu LDH-A a utíšenie LDH-A u nich vyvoláva oxidatívny stres a inhibuje progresiu nádora [64,65].

Štúdie interakcie HSF1 s chromatinom ukázali, že cicavčí HSF1 sa zúčastňuje na regulácii energetického metabolizmu [33,66]. Napríklad knock-out HSF1 u myších embryonálnych fibroblastov spôsobil, že sa tieto bunky ľahšie adaptovali na podmienky s nízkou glukózou a mali zníženú aktivitu LDH-A [33]. V HER2+ BC závisí aktivita LDH-A od HSF1, ktorý sa viaže na promótor génu *LDHA* a spúšťa jeho expresiu. Naopak knock-out HSF1 v týchto bunkách spôsobuje inhibíciu expresie génu *LDHA*, zníženie glykolýzy a chybný rast buniek [67].

HSF1 a AMPK

AMPK je hlavný senzor metabolického stresu, ktorý hrá dôležitú úlohu pri udržiavaní energetickej rovnováhy. Zvýšením pomeru adenosínmonofosfát (adenosine monophosphate – AMP)/adenosíntrifosfát (adenosine triphosphate – ATP) v podmienkach metabolického stresu dochádza prostredníctvom fosforylácie Thr172 k aktivácii AMPK [68]. Phospho-AMPK (P-AMPK) sa následne účastní na potláčaní procesov, ktoré spotrebávajú ATP, akými sú napr. proteosyntéza alebo produkcia lipidov [68]. V podmienkach nedostatku ATP a zníženej proteosyntézy nie je pre bunku výhodné udržiavať vysokú expresiu chaperónov, ktorá je závislá od ATP [69]. P-AMPK preto v týchto podmienkach fosforyluje HSF1 na S121, inaktivuje ho a tým znižuje expresiu HSPs [70]. Zhou et al pozorovali v nádoroch pankreasu potlačenú aktivitu tumor-supresoru AMPK, ktorá korelovala so zlou prognózou pacientov. Knock-out AMPK v pankreatických nádorových líniách je asociovaný so zvýšenou aktivi-

ťou HSF1 a podporuje invazivitu a migráciu týchto buniek v miere závislej na HSF1 [70,71]. Identifikácia HSF1 ako substrátu AMPK poukazuje na vzťah medzi metabolickým a proteotoxickým stresom, čo by mohlo byť zaujímavé z hľadiska protinádorovej terapie. Príkladom možnej terapie zameranej na signalizáciu AMPK-HSF1 je metformín, ktorý je celosvetovo používaný k liečbe diabetes mellitus 2. typu. Metformín účinkuje ako metabolický stresor, ktorý inhibuje mitochondriálny dýchací reťazec, zvyšuje pomer AMP/ATP a tým sa podieľa na AMPK sprostredkovannej inhibícii HSF1 [58,72].

HSF1 ako cieľ protinádorovej terapie

Vďaka zvýšenej aktivite a expresii HSF1 a ním regulovaných chaperónov v nádorových bunkách predstavuje HSF1 potenciálny cieľ protinádorovej terapie. Znížená aktivita HSF1 v nádorových bunkách vedie k poklesu proliferácie a ku zvýšenej miere apoptózy [33]. Nízkomolekulárne inhibítory HSF1 by tak mohli byť potenciálne využívané ako súčasť protinádorovej terapie. Inhibítory HSF1 sa dajú rozdeliť na dve skupiny:

1. Tzv. nepriame inhibítory, ktorých aplikácia zamedzí vzniku podmienok aktivujúcich HSF1. Podľa súčasných poznatkov je HSF1 aktivovaný v podmienkach zvýšenej expresie proteínov alebo následkom ich agregácie. Všeobecne teda platí, že podmienky destabilizujúce proteostázu indukujú aktiváciu HSF1 [73]. Naopak podmienky znižujúce produkciu proteínov vyvolané napr. inhibíciou translácie (cykloheximid, rocaglamid), inhibíciou mTOR a aktiváciou AMPK (salicylát) môžu slúžiť k inaktivácii HSF1. Skupinu spomenutých inhibítorov proteosyntézy teda môžeme klasifikovať ako nepriame inhibítory HSF1.
2. Druhú skupinu reprezentujú inhibítory, ktoré potláčajú expresiu HSPs priamo cez väzbu na HSF1. Hovoríme teda o priamych inhibítoroch, ktoré zahŕňajú napr. KRIBB11, AptHSF-RA1 alebo I_{HSF} 115. Sľubné výsledky prinieslo testovanie inhibítora KRIBB11, ktorý v rôznych nádorových bunkových líniách znižuje proliferá-

ciu a v myších modeloch znižuje rast nádorov, a to bez straty ich telesnej hmotnosti. KRIBB11 pôsobí prostredníctvom reverzibilnej väzby na HSF1, ktorou bráni väzbe p-TEFb, nevyhnutného pre aktiváciu RNA polymerázy II, a zahájenie transkripcie [74]. Odlíšnym mechanizmom pôsobí RNA aptamér AptHSF-RA1, ktorý sa viaže na DNA väzbovú doménu HSF1, čím zamedzuje jeho naviazaniu na promotórové oblasti HSPs. U bunkovej línie HeLa bolo po transfekcii AptHSF1-RA1 oproti kontrolným vzorkám pozorované 9-násobné zvýšenie mortality v bunkovej kultúre [75,76]. I_{HSF}115 je ďalším priamym inhibítorom HSF1, ktorý ovplyvňuje priamo jeho transaktívnu funkciu. ATF1/CREB reguluje stresom-indukovanú odpoveď tepelného šoku pomocou tvorby transkripčného komplexu s HSF1 a umožňuje tak nasadenie HSF1 na cieľové promotory. I_{HSF}115 sa viaže na DNA väzbovú doménu HSF1 a výrazne znižuje interakciu HSF1-ATF1 [77]. Predpokladá sa preto, že I_{HSF}115 interferuje s formovaním transkripčných komplexov nevyhnutných pre zahájenie HSF1-sprostredkovanej transkripcie.

Záver

HSF1 je transkripčným faktorom dvoch tvárí. Na jednej strane sa obecné podieľa na ochrane bunky pred proteotoxickým stresom, ale zároveň napomáha nádorovým bunkám prispôbiť sa zvýšeným nárokom vyvolaných malígnou transformáciou. Všeobecne sa dajú jeho onkogénne úlohy rozdeliť na:

- a) reguláciu proteínov HSPs, ktoré ako molekulárne chaperóny stabilizujú veľké množstvo klientských proteínov esenciálnych pre prežitie nádorových buniek (napr. mutovaný p53);
- b) zapojenie v množstve signálnych dráh (AMPK, PI3K-AKT-mTOR), ktoré sú zodpovedné za proliferáciu, EMT, invazivitu, alebo migráciu;
- c) reguláciu energetického metabolizmu, ktorý predstavuje charakteristickú črtu nádorových buniek. Zvýšená hladina HSF1 koreluje so zvýšenou agresivitou onkologického ochorenia a so zlou prognózou pre pacienta. Vďaka jeho pleiotrop-

nej úlohe je HSF1 nielen významným diagnostickým a prognostickým markerom, ale aj zaujímavým potenciálnym cieľom protinádorovej terapie.

Literatúra

1. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 1962; 18(12): 571–573.
2. Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 1974; 84(3): 389–398.
3. Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 14): 2809–2816.
4. Nover L, Bharti K, Döring P et al. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* 2001; 6(3): 177–189.
5. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 2001; 15(7): 1118–1131.
6. Westerheide SD, Raynes R, Powell C et al. HSF transcription factor family, heat shock response, and protein intrinsic disorder. *Curr Protein Pept Sci* 2012; 13(1): 86–103.
7. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(8): 545–555. doi: 10.1038/nrm2938.
8. Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(1): 11–22. doi: 10.1038/nrn1587.
9. Mendillo ML, Santagata S, Koeva M et al. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell* 2012; 150(3): 549–562. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.031.
10. Harrison CJ, Bohm AA, Nelson HC. Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* 1994; 263(5144): 224–227.
11. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998; 12(24): 3788–3796.
12. Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ et al. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell* 2004; 15(3): 1254–1261. doi: 10.1091/mbc.e03-10-0738.
13. Hentze N, Le Breton L, Wiesner J et al. Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1. *Elife* 2016; 5: pii: e11576. doi: 10.7554/eLife.11576.
14. Zou J, Guo Y, Guettouche T et al. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 1998; 94(4): 471–480.
15. Ali A, Bharadwaj S, O’Carroll R et al. HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* 1998; 18(9): 4949–4960.
16. Neef DW, Jaeger AM, Gomez-Pastor R et al. A direct regulatory interaction between chaperonin Tric and stress-responsive transcription factor HSF1. *Cell Rep* 2014; 9(3): 955–966. doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.056.
17. Ishiwata J, Kasamatsu A, Sakuma K et al. State of heat shock factor 1 expression as a putative diagnostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2012; 40(1): 47–52. doi: 10.3892/ijo.2011.1178.
18. Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM et al. Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 2003; 23(8): 2953–2968.

19. Wang X, Khaleque MA, Zhao MJ et al. Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. *J Biol Chem* 2006; 281(2): 782–791. doi: 10.1074/jbc.M505822200.
20. Chu B, Zhong R, Soncin F et al. Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta. *J Biol Chem* 1998; 273(29): 18640–18646.
21. Dai R, Frejtag W, He B et al. c-Jun NH2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. *J Biol Chem* 2000; 275(24): 18210–18218. doi: 10.1074/jbc.M000958200.
22. Kline MP, Morimoto RI. Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1997; 17(4): 2107–2115.
23. Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A et al. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J* 2001; 20(14): 3800–3810. doi: 10.1093/emboj/20.14.3800.
24. Murshid A, Chou SD, Prince T et al. Protein kinase A binds and activates heat shock factor 1. *PLoS One* 2010; 5(11): e13830. doi: 10.1371/journal.pone.0013830.
25. Chou SD, Prince T, Gong J et al. mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. *PLoS One* 2012; 7(6): e39679. doi: 10.1371/journal.pone.0039679.
26. Xu YM, Huang DY, Chiu JF et al. Post-translational modification of human heat shock factors and their functions: a recent update by proteomic approach. *J Proteome Res* 2012; 11(5): 2625–2634. doi: 10.1021/pr201151a.
27. Core LJ, Lis JT. Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science* 2008; 319(5871): 1791–1792. doi: 10.1126/science.1150843.
28. Ni Z, Schwartz BE, Werner J et al. Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by p-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol Cell* 2004; 13(1): 55–65.
29. Hoang AT, Huang J, Rudra-Ganguly N et al. A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2000; 156(3): 857–864. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64954-1.
30. Santagata S, Hu R, Lin NU et al. High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(45): 18378–18383. doi: 10.1073/pnas.1115031108.
31. Cen H, Zheng S, Fang YM et al. Induction of HSF1 expression is associated with sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10(21): 3122–3126.
32. Fang F, Chang R, Yang L. Heat shock factor 1 promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer* 2012; 118(7): 1782–1794. doi: 10.1002/cncr.26482.
33. Dai C, Whitesell L, Rogers AB et al. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* 2007; 130(6): 1005–1018. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.020.
34. Craig EA. The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem* 1985; 18(3): 239–280.
35. Schulz R, Streller F, Scheel AH et al. HER2/ErbB2 activates HSF1 and thereby controls HSP90 clients including MIF in HER2-overexpressing breast cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5: e980. doi: 10.1038/cddis.2013.508.
36. Meng L, Gabai VL, Sherman MY. Heat-shock transcription factor HSF1 has a critical role in human epidermal growth factor receptor-2-induced cellular transformation and tumorigenesis. *Oncogene* 2010; 29(37): 5204–5213. doi: 10.1038/onc.2010.277.
37. Xi C, Hu Y, Buckhaults P et al. Heat shock factor Hsf1 cooperates with ErbB2 (Her2/Neu) protein to promote mammary tumorigenesis and metastasis. *J Biol*

- Chem 2012; 287(42): 35646–35657. doi: 10.1074/jbc.M112.377481.
38. Wiech M, Olszewski MB, Tracz-Gaszewska Z et al. Molecular mechanism of mutant p53 stabilization: the role of HSP70 and MDM2. *PLoS One* 2012; 7(12): e51426. doi: 10.1371/journal.pone.0051426.
39. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005; 10(2): 86–103.
40. Jacobs AT, Marnett LJ. HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Biol Chem* 2009; 284(14): 9176–9183. doi: 10.1074/jbc.M808656200.
41. Wang GL, Jiang BH, Rue EA et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(12): 5510–5514.
42. Bindra RS, Schaffer PJ, Meng A et al. Alterations in DNA repair gene expression under hypoxia: elucidating the mechanisms of hypoxia-induced genetic instability. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1059(1): 184–195. doi: 10.1196/annals.1339.049.
43. Piret J-P, Cosse J-P, Ninane N et al. Hypoxia protects HepG2 cells against etoposide-induced apoptosis via a HIF-1-independent pathway. *Exp Cell Res* 2006; 312(15): 2908–2920. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.05.018.
44. Um JH, Kang CD, Bae JH et al. Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells. *Exp Mol Med* 2004; 36(3): 233–242. doi: 10.1038/emmm.2004.32.
45. Shen C, Nettleton D, Jiang M et al. Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2005; 280(21): 20580–20588. doi: 10.1074/jbc.M501894200.
46. Liu G, Roy J, Johnson EA. Identification and function of hypoxia-response genes in *Drosophila melanogaster*. *Physiol Genomics* 2006; 25(1): 134–141. doi: 10.1152/physiolgenomics.00262.2005.
47. Nakano M, Mann DL, Knowlton AA. Blocking the endogenous increase in HSP 72 increases susceptibility to hypoxia and reoxygenation in isolated adult feline cardiocytes. *Circulation* 1997; 95(6): 1523–1531.
48. Kabakov AE, Budagova KR, Bryantsev AL et al. Heat shock protein 70 or heat shock protein 27 overexpressed in human endothelial cells during posthypoxic reoxygenation can protect from delayed apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 2003; 8(4): 335–347.
49. Baird NA, Turnbull DW, Johnson EA. Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 2006; 281(50): 38675–38681. doi: 10.1074/jbc.M608013200.
50. Zhou J, Schmid T, Frank R et al. PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem* 2004; 279(14): 13506–13513. doi: 10.1074/jbc.M310164200.
51. Minet E, Mottet D, Michel G et al. Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett* 1999; 460(2): 251–256.
52. Kubo M, Li T-S, Kurazumi H et al. Heat shock factor 1 contributes to ischemia-induced angiogenesis by regulating the mobilization and recruitment of bone marrow stem/progenitor cells. *PLoS One* 2012; 7(5): e37934. doi: 10.1371/journal.pone.0037934.
53. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244(4905): 707–712.
54. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH et al. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987; 237(4811): 178–182.
55. Nahta R. Molecular mechanisms of trastuzumab-based treatment in HER2-overexpressing breast cancer. *ISRN Oncol* 2012; 2012: 428062. doi: 10.5402/2012/428062.
56. Zhang Y, Chou SD, Murshid A et al. The role of heat shock factors in stress-induced transcription. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2011; 787: 21–32. doi: 10.1007/978-1-61779-295-3_2.
57. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(5): 307–318. doi: 10.1038/nrm2672.
58. Wang Y, Xu W, Yan Z et al. Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *J Exp Clin Cancer Res* 2018; 37(1): 63. doi: 10.1186/s13046-018-0731-5.
59. De Craene B, Bex G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(2): 97–110. doi: 10.1038/nrc3447.
60. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62(6): 1613–1618.
61. Carpenter RL, Paw I, Dewhirst MW et al. Akt phosphorylates and activates HSF-1 independent of heat shock, leading to Slug overexpression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Oncogene* 2015; 34(5): 546–557. doi: 10.1038/onc.2013.582.
62. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930): 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.
63. Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C et al. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39(3): 267–274. doi: 10.1007/s10863-007-9086-x.
64. Kim J, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Res* 2006; 66(18): 8927–8930. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1501.
65. Le A, Cooper CR, Gouw AM et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(5): 2037–2042. doi: 10.1073/pnas.0914433107.
66. Hahn JS, Thiele DJ. Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase. *J Biol Chem* 2004; 279(7): 5169–5176. doi: 10.1074/jbc.M311005200.
67. Zhao YH, Zhou M, Liu H et al. Upregulation of lactate dehydrogenase A by ErbB2 through heat shock factor 1 promotes breast cancer cell glycolysis and growth. *Oncogene* 2009; 28(42): 3689–3701. doi: 10.1038/onc.2009.229.
68. Hardie DG. AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 2011; 25(18): 1895–1908. doi: 10.1101/gad.17420111.
69. Welch WJ. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3(6): 1033–1038.
70. Dai S, Tang Z, Cao J et al. Suppression of the HSF1-mediated proteotoxic stress response by the metabolic stress sensor AMPK. *EMBO J* 2015; 34(3): 275–293. doi: 10.15252/embj.201489062.
71. Chen K, Qian W, Li J et al. Loss of AMPK activation promotes the invasion and metastasis of pancreatic cancer through an HSF1-dependent pathway. *Mol Oncol* 2017; 11(10): 1475–1492. doi: 10.1002/1878-0261.12116.
72. Foretz M, Guigas B, Bertrand L et al. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* 2014; 20(6): 953–966. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.018.
73. Shah SP, Nooka AK, Jaye DL et al. Bortezomib-induced heat shock response protects multiple myeloma cells and is activated by heat shock factor 1 serine 326 phosphorylation. *Oncotarget* 2016; 7(37): 59727–59741. doi: 10.18632/oncotarget.10847.
74. Yoon YJ, Kim JA, Shin KD et al. KRIBB1 Inhibits HSP70 synthesis through inhibition of heat shock factor 1 function by impairing the recruitment of positive transcription elongation factor B to the HSP70 promoter. *J Biol Chem* 2011; 286(3): 1737–1747. doi: 10.1074/jbc.M110.179440.
75. Salamanca HH, Fuda N, Shi H et al. An RNA aptamer perturbs heat shock transcription factor activity in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(15): 6729–6740. doi: 10.1093/nar/gkr206.
76. Salamanca HH, Antonyak MA, Cerione RA et al. Inhibiting heat shock factor 1 in human cancer cells with a potent RNA aptamer. *PLoS one* 2014; 9(5): e96330. doi: 10.1371/journal.pone.0096330.
77. Vilaboa N, Boré A, Martín-Saavedra et al. New inhibitor targeting human transcription factor HSF1: effects on the heat shock response and tumor cell survival. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(10): 5797–5817. doi: 10.1093/nar/gkx194.

Proteíny HDM2 a HDMX v lidských nádorech

HDM2 and HDMX Proteins in Human Cancer

Hároníková L., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Súhrn

Východiská: Proteíny HDM2 a HDMX sú hlavné negatívne regulátory tumorového supresoru p53. Ich úlohou je udržiavať nízku hladinu proteínu p53 za normálnych podmienok. V stresových podmienkach je však táto negatívna regulácia prerušená, čo umožní aktiváciu p53 dráhy. V mnohých ľudských nádoroch, ktoré si zachovávajú wild type p53, bola nájdená nadmerná expresia proteínov HDM2 a HDMX, ako napr. v sarkóme. A tak okrem inaktivujúcej mutácie v géne pre proteín p53, modulácia expresie proteínov HDM2 a HDMX predstavuje alternatívny mechanizmus inaktívácie signálnej dráhy p53. **Ciel:** V tomto zhrnutí stručne predstavíme funkciu proteínov HDM2 a HDMX, zhrnieme informácie o zvýšenom výskyte proteínov HDM2 a HDMX v ľudských nádoroch, jeho možné príčiny a predstavíme rôzne prístupy k potenciálnej liečbe nádorov založenej na cielení na proteíny HDM2 a HDMX. **Záver:** HDM2 a HDMX sa stali zaujímavými cieľmi protinádorovej terapie, kedy prerušenie negatívnej regulácie p53 pomocou látok, ako napr. nutlinov, môže viesť k reaktivácii p53 odpovede a k potlačeniu rakovinového bujenia. Nové poznatky o funkcii a štruktúre proteínov HDM2, HDMX a p53 umožňujú návrh nových druhov terapeutík, čo môže prispieť k špecifickej liečbe a efektívnejšej odpovedi pacientov. Mnohé z látok sú už testované v rámci klinických štúdií fázy I, II a III.

Kľúčové slová

HDM2 – HDMX – signálna dráha p53 – onkogény – MDM2 – MDMX

Summary

Background: HDM2 and HDMX proteins are key negative regulators of the tumor suppressor p53. Under normal conditions, p53 protein expression is maintained at a low level, whereas under stress conditions, this negative regulation is alleviated to increase the p53 level. HDM2 and HDMX are overexpressed in many cancer types, mainly in tumors with wild type p53, such as sarcomas. In addition to an inactivating mutation in the TP53 gene, HDM2 and HDMX overexpression represents another kind of p53 inactivation pathway. **Aim:** In this review, we first briefly describe the roles of HDM2 and HDMX proteins and then the increased occurrence of their overexpression and the possible causes of this overexpression in different human cancer types as well as therapeutic approaches targeting HDM2 and HDMX for the treatment of human cancer. **Conclusion:** HDM2 and HDMX are important therapeutic targets. The interruption of their negative effect on p53 pathway by compounds such as nutlins, leads to the reactivation of the p53 pathway. However, a deeper understanding of HDM2-HDMX-p53 structure and function will enable the identification of new therapeutic strategies that could help to provide more specific and more efficient therapies for cancer patients. Several small molecules and peptides are the subject of clinical testing in phase I, II and even III trials.

Key words

HDM2 – HDMX – p53 signalling pathway – oncogenes – MDM2 – MDMX

Práca bola podporená projektom MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Lucia Hároníková, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: lucia.haronikova@mou.cz

Přijato/Accepted: 16. 7. 2018

doi: 10.14735/amko20182563

Úvod

Proteíny HDM2 (human double minute 2 proteín, nazývaný aj MDM2) a HDMX (human double minute X proteín, nazývaný aj MDMX, MDM4, HDM4) sú paralogne proteíny patriace do rodiny MDM (mouse double minute). Obidva proteíny hrajú nezastupiteľnú úlohu v regulácii stability p53, ale podieľajú sa aj na mnohých iných procesoch, ako napr. opravách poškodenej DNA, translačnej regulácii, regulácii ribozomálneho stresu [1]. Významný vplyv proteínov HDM2 a HDMX bol preukázaný *in vivo* na myších modeloch. Myši s MDM2^{-/-} a MDMX^{-/-} vykazovali veľmi skorú embryonálnu letalitu a zároveň bolo zistené, že tejto letalite sa dá zabrániť, pokiaľ je vyradený aj proteín p53 [2,3]. Sú to onkogénne proteíny, ktoré sú často nadmerne exprimované, najmä v tumoroch s wild type p53. Pri nadmernej expresii sú zodpovedné za nadmerné odbúravanie proteínu p53, obmedzenie jeho transkripčnej funkcie, ale spôsobujú aj genómovú nestabilitu a tým všetkým prispievajú ku vzniku nádorov. Dlhodobý výskum v oblasti MDM proteínov poukazuje na ich neprekrývajúce sa, ale doplnujúce sa funkcie v regulácii p53 signálnej dráhy a iných. Vďaka novým poznatkom sú vyvíjané liečivá, ktoré špecificky cielia na obmedzenie funkcie nie len HDM2 proteínu, ale aj HDMX.

Funkcia proteínov HDM2 a HDMX

Najlepšie preštudovanou a pravdepodobne aj najdôležitejšou úlohou proteínov HDM2 a HDMX je ich regulácia proteínu p53, a to skrz vplyv na stabilitu, ale aj transkripčnú aktivitu proteínu p53. Hladina proteínu p53 musí byť prísne regulovaná v závislosti na podmienkach. V normálnych podmienkach je potrebné, aby bola hladina p53 nízka a bunka mohla prechádzať bunkovým cyklom. V tomto prípade proteíny HDM2 a HDMX interagujú s proteínom p53 a spôsobujú jeho proteazomálnu degradáciu. Proteín HDM2 svojou E3-ligázovou aktivitou v súčinnosti s E2-ligázou katalyzuje polyubikvitináciu proteínu p53 na lyzínoch v DNA-väzbovej a C-terminálnej doméne. Takto označený proteín p53 je odbúraný pomocou

proteazómu [4]. Proteín HDMX nie je funkčnou E3 ligázou, ale svojou schopnosťou tvoriť heterodiméry s proteínom HDM2 priamo zvyšuje účinnosť ubikvitinácie proteínu p53 [5,6]. Ďalší mechanizmus, akým môže HDM2 a HDMX ovplyvniť funkciu p53, je skrz blokovanie transkripčnej aktivity p53. Proteín HDM2 aj HDMX sa viaže do N-terminálnej transaktivačnej domény p53. Naviazanie proteínu HDM2 skrz transaktivačnú doménu p53 blokuje možnosť proteínu p53 viazať sa s transkripčnou mašínou [7,8]. Avšak využitím myších modelov, ktoré exprimovali HDM2 s mutovanou RING (really interesting new gene) doménou bez schopnosti ubikvitinácie, bolo preukázané, že hlavný mechanizmus, akým HDM2 potláča funkciu p53, je skrz jeho odbúravanie cez proteazóm, a nie cez blokovanie transkripčnej aktivity [9]. Proteín HDMX sa viaže s proteínom p53 taktiež cez svoju N-terminálnu doménu. Tejto väzbe bola taktiež pripisovaná schopnosť blokovať transkripčnú aktivitu proteínu p53 [10]. Neskôr boli identifikované aj interakcie ďalších domén vedúcich k ovplyvneniu transkripčnej aktivity proteínu p53, a to kyslej domény HDM2 a DNA-väzbovej domény p53 [11,12] a taktiež kyslej domény HDMX a DNA-väzbovej domény p53, čo vedie k inhibícii väzby p53 k DNA [13]. Interakcia HDM2-HDMX-p53 je veľmi komplexná a je závislá na alosterických zmenách všetkých troch proteínov [14].

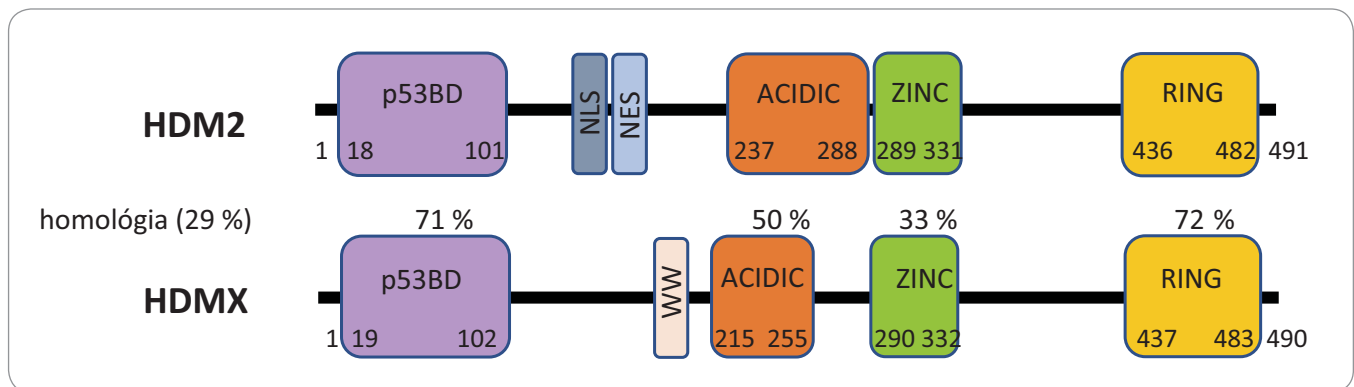
V prípade stresových podmienok, ako je napr. poškodenie DNA, je potrebné, aby sa rýchlo zvýšila hladina proteínu p53 a ten mohol vykonať svoju funkciu (zastavenie bunkového cyklu v prípade menšieho poškodenia alebo vyvolanie apoptózy v prípade väčšieho poškodenia). V tomto prípade je nevyhnutné, aby bola interakcia p53 s proteínmi HDM2 a HDMX prerušená. V prípade poškodenia DNA je aktivovaná ATM kináza (ataxia-telangiectasia mutated), ktorá vedie k fosforylácii proteínu p53 na Ser15 a proteínov HDM2 na Ser395 a HDMX na Ser403. Proteíny HDM2 a HDMX sú po fosforylácii schopné efektívnejšie viazať p53 mRNA a prerušuje sa interakcia s proteínom p53 [15–17]. Ubikvitinačná aktivita pro-

teínu HDM2 je presmerovaná na samotný proteín HDM2 a HDMX, čím dochádza k ich odbúravaniu [18].

Po odpovedi p53 je nutné, aby sa hladina proteínu p53 opäť znížila. K tomu je potrebné, aby bola obnovená dostatočná hladina proteínov HDM2 a HDMX. To je zabezpečené spätno-väzbovou reguláciou, kedy zvýšená hladina p53 vedie k aktivácii transkripčného programu p53. Dochádza k prepisu génov *HDM2* a *HDMX* a novo vzniknuté proteíny HDM2 a HDMX sa môžu opäť podieľať na odbúraní proteínu p53 [19–21].

Interakcia proteínu p53 s HDM2 a HDMX je regulovaná mnohými proteín-proteínovými interakciami. Proteín HDM2 interaguje s plejádou rôznych proteínov, ktoré majú dopad na funkciu proteínu p53. Napríklad proteín ARF (alterante reading frame protein) sa viaže do kyslej domény HDM2, blokuje E3-ligázovú aktivitu HDM2 voči p53 a blokuje export proteínu p53 z jadra závislý na HDM2 [22]. HDMX taktiež interaguje s proteínom ARF, čím ovplyvňuje stabilitu proteínu HDM2 [23,24]. Medzi ďalšie interagujúce proteíny patria ribozomálne proteíny, ako napr. RPL5, RPL11, RPL23, ktoré taktiež limitujú E3-ligázovú funkciu HDM2 [25]; proteín p300, ktorý tvorí komplex s HDM2 aj HDMX a umožňuje aktiváciu p53 v stresových podmienkach [26,27] a mnohé iné.

Okrem vplyvu proteínov HDM2 a HDMX na aktiváciu p53 odpovede bola popísaná aj ich funkcia nezávislá na proteíne p53. Obidva proteíny inhibujú opravu poškodenia DNA skrz ich asociáciu s DNA-reparačným komplexom MRN tvoreným proteínmi MRE11/RAD50/NBS1 (meiotic recombination 11 homolog 1/DNA repair protein RAD50/DNA repair and telomere maintenance protein NBS1). HDM2 aj HDMX sú viazané ku komplexu skrz proteín NBS1 a spôsobujú spomalenie opráv DNA. Takýmto spôsobom obidva proteíny môžu prispievať ku genómovej nestabilite a tumorigenéze [28]. Taktiež bola popísaná ich účasť v kontrole translácie určitých proteínov skrz ich väzbu k mRNA. V prípade HDM2 tak bol popísaný okrem kontroly translácie proteínu p53 [16] aj vplyv na transláciu proteínov XIAP (X-linked inhibitor of



Obr. 1. Schématické znázornenie štruktúry proteínov HDM2 a HDMX a ich homológie.

p53BD – p53 väzbová doména, ACIDIC – kyslá doména, ZINC – doména zinkového prstu, RING – RING doména, NLS – jadrový lokalizačný signál, NES – signál pre export z jadra, WW – autoregulačný motív

apoptosis protein) [29], SLUG (taktiež nazývaný SNAI2 – proteín snail homolog 2) [30], MYCN (N-myc proto-oncogene protein) [31], VEGF (vascular endothelial growth factor) [32].

Štruktúra proteínov HDM2 a HDMX

Proteíny HDM2 a HDMX sú paralógne proteíny zhodné na 30 % svojou sekvenciou. Obidva proteíny sú zložené zo 4 usporiadaných domén, medzi ktorými sa nachádzajú veľké úseky vnútorne neusporiadaných častí (obr. 1).

Na N-terminálnom konci obidvoch proteínov sa nachádza p53 väzbová doména, ktorá je v proteínoch zhodná z 71 % a je zodpovedná za väzbu a reguláciu proteínu p53. Aminokyseliny, ktoré sú nevyhnutné pre väzbu s proteínom p53, sú konzervované u obidvoch proteínov [10] a taktiež proteín p53 využíva na väzbu k obidvom proteínom rovnaké aminokyseliny [33]. Avšak dôkladná röntgenová štruktúrna analýza odhalila rozdiely v usporiadaní p53 väzbovej kapsy u proteínu HDM2 a HDMX. V prípade proteínu HDMX postranné reťazce dvoch aminokyselín spôsobujú uzavretejšiu konformáciu hydrofóbnej štruktúry, ktorá sa viaže k p53 [34].

Za N-terminálnou doménou sa nachádzajú neusporiadané časti proteínov. Proteín HDM2 obsahuje sekvenciu nazývanú jadrový lokalizačný signál (nuclear localization signal – NLS), ktorá umožňuje premiestnenie proteínu do jadra. Za ňou sa nachádza sekvencia nazývaná signál pre export z jadra (nuclear export sig-

nal – NES), umožňujúca naopak export proteínu z jadra do cytoplazmy. Proteín HDMX tieto signály neobsahuje. Je primárne lokalizovaný v cytoplazme bunky, avšak na základe interakcií s inými proteínmi, ako napr. s HDM2, môže byť premiestnený do jadra a späť [35]. Proteín HDMX navyše obsahuje za N-terminálnou doménou autoregulačný sekvencný motív (aminokyseliny TRP200 a TRP201) nazývaný aj WW motív. Ten sa viaže k p53 väzbovej doméne na N-terminálnom konci samotného HDMX a tým blokuje schopnosť proteínu viazať sa k p53. Strata tohto motívu vedie až k 32-násobnému navýšeniu väzby HDMX s proteínom p53 [36].

V centrálnej časti proteínov sa nachádza kyslá doména (ACIDIC), kde je prítomných viacero kyslých aminokyselín. V proteíne HDM2 hrá táto doména pomocnú úlohu pri degradácii proteínu p53 [37,38]. Najnovšie poznatky ukazujú, že kyslá doména proteínu HDMX je taktiež dôležitá pri regulácii p53, a to cez väzbu kyslej domény HDMX k centrálnej DNA väzbovej doméne proteínu p53, čím dochádza k zablokovaniu funkcie proteínu p53 [13,39]. Za kyslou doménou sa nachádza doména zinkového prstu. Tvorí miesto pre interakciu s mnohými proteínmi, napr. s inhibítorom proteínu HDM2, proteínom ARF [40]. Táto doména je taktiež kľúčová pri väzbe s ribozomálnymi proteínmi RPL5, RPL11, RPL23. Mutácie v zinkovom prste (najmä v jednom z cysteínov, ktoré tvoria štruktúru C4 zinkového prstu) narúšajú správnu funkciu pro-

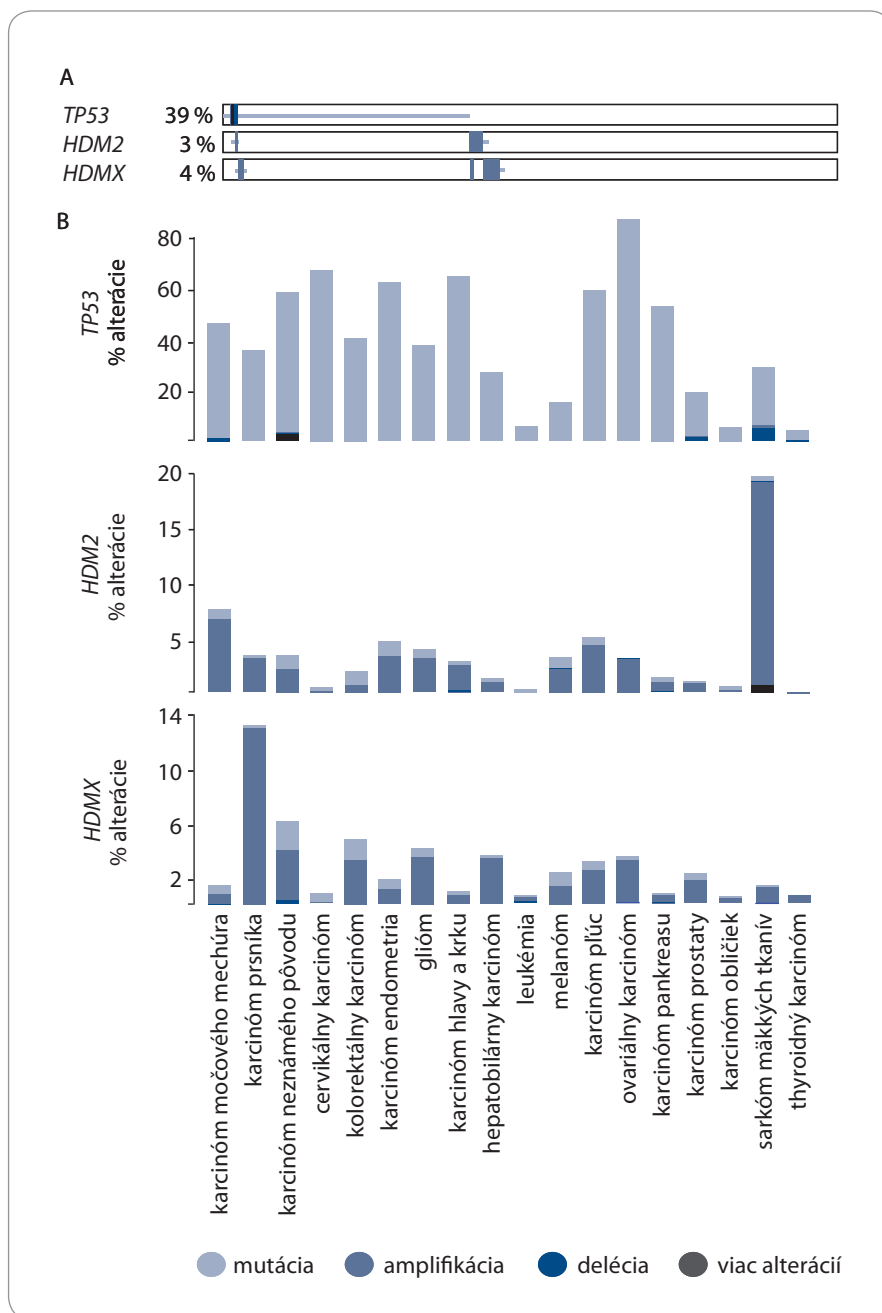
teínu HDM2 a sú spájané s predispozíciou vzniku rakoviny [41].

Na C-konci proteínov HDM2 a HDMX sa nachádza RING doména, ktorá je opäť veľmi konzervovaná. RING doména proteínu HDM2 je priamo zodpovedná za degradáciu p53, a to svojou E3-ubikvitín ligázovou aktivitou. Napriek veľkej sekvencnej homológii RING domény (72 %), HDMX nie je funkčnou E3 ligázou. RING doména obidvoch proteínov slúži aj k proteín-proteínovým interakciám s inými RING-obsahujúcimi proteínmi. Dochádza najmä k interakcii medzi proteínmi HDM2 a HDMX, tzv. heterodimerizácii, ktorá zvyšuje stabilitu proteínov HDM2 a HDMX [42]. Proteín HDM2 vytvára cez RING doménu aj homodiméry. Táto vlastnosť nebola u HDMX pozorovaná. Obidva proteíny obsahujú v svojej RING doméne P-slučku, ktorá umožňuje väzbu molekúl adenosintrifosfátu (adenozintrifosfátu – ATP) [43,44]. RING doméne je pripisovaná aj schopnosť viazať sa špecificky k určitému typu RNA, ako napr. k p53 mRNA [15,17], k XIAP mRNA [45].

Proteíny HDM2 a HDMX majú v plnej dĺžke 491 a 490 aminokyselín. Skrz alternatívny zostrih sú v bunkách prítomné aj rôzne izoformy proteínov, čo predstavuje ďalšiu rovinu regulácie nie len ich možnej štruktúry, ale aj ich funkcie [46].

Hladina proteínov HDM2 a HDMX v nádoroch

Proteín MDM2 (mouse double minute 2, myšičia homológ ľudského proteínu



Obr. 2. Frekvencia alterácie a výskyt alterácie génov TP53, HDM2 a HDMX u vybraných typov karcinómov.

A. Percentuálne znázornenie alterácie pre TP53, HDM2 a HDMX. B. Výskyt alterácie pre TP53, HDM2 a HDMX v typoch karcinómov, kde bolo evaluovaných 500 a viac vzoriek [65].

HDM2) bol prvýkrát objavený v myších bunkách 3T3-DM na základe zvýšeného výskytu amplifikácie génu *MDM2* [47]. Neskôr bola popísaná jeho asociácia s proteínom p53 a bol pozorovaný represívny vplyv proteínu MDM2 na transkripčnú aktivitu proteínu p53 [48]. Už v roku 1992 Oliner et al pozorovali zvýšenú hladinu proteínu HDM2 u približne

jednej tretiny prípadov ľudského sarkómu. Zaujímavou skutočnosťou je, že tieto prípady sarkómu si zachovávali wild type formu proteínu p53 [49]. Neskôršie štúdie na väčšom počte vzoriek potvrdili amplifikáciu *HDM2* v mnohých podtypoch sarkómu, ako napr. v osteosarkóme, liposarkóme, lipóme [50–54]. Zvýšená hladina HDM2 bola pozoro-

vaná na úrovni proteínu aj na úrovni mRNA. Mnohé štúdie preukázali zvýšenú hladinu proteínu HDM2 v rôznych typoch rakoviny, ako napr. v malignom glióme [55], v rakovine prsníka [56,57], v rakovine pľúc [58].

Proteín HDMX bol objavený ako ďalší regulátor p53 na základe svojej podobnosti na proteín HDM2 a svojej schopnosti priamo interagovať s proteínom p53 [10]. Tak ako HDM2, aj HDMX je nadmerne exprimovaný v niektorých typoch rakoviny. Jeho zvýšený výskyt bol pozorovaný u podobných typov rakoviny ako v prípade HDM2, napr. v glioblastóme [59], v sarkóme [60] a v rakovine prsníka [61,62]. Navyše bol pozorovaný zvýšený výskyt proteínu HDMX aj v retinoblastóme, kde môže zohrávať hlavnú úlohu v inaktivácii signálnej dráhy p53 v RB1-deficientných bunkách (retinoblastoma protein 1 – RB1) [63].

Stanovenie hladiny proteínov HDM2 a HDMX odhalilo, že proteíny sú exprimované rôzne v závislosti na type tkaniva a podmienok. Avšak porovnaním normálnych a rakovinových buniek sa preukázala nadmerná expresia týchto onkoproteínov takmer vo všetkých typoch nádorov a môže byť spôsobená skrz génovú alteráciu amplifikáciou génu, alebo nadmernou transkripčnou aktiváciou, transláciou a post-translačnými modifikáciami.

Z hľadiska génovej alterácie proteínu HDM2 a HDMX, na rozdiel od ich hlavného interakčného partnera p53, sú mutované len výnimočne. Najčastejšou alteráciou je už zmienená génová amplifikácia. V roku 2016 Oliner et al analyzovali dostupné dáta týkajúce sa alterácie génu *HDM2* z databázy The Cancer Genome Atlas. Kritérium pre relevantnú *HDM2* amplifikáciu autori nastavili ako vzájomnú výhradnosť s mutáciou proteínu p53. To znamená, že za amplifikáciu *HDM2* bol považovaný taký počet kópií génu, kedy zvýšená hladina HDM2 a mutácia p53 sa nevyskytovali zároveň v tej istej vzorke. Takto bola stanovená amplifikácia *HDM2* u 1,2 % vzoriek primárnych tumorov, avšak distribúcia medzi typmi tumorov bola veľmi rozdielna s najčastejším výskytom v sarkóme (18,7 %), glioblastóme (7,2 %) a uroteliálnom karcinóme (2,9 %) [64].

Podľa portálu cbiportal.org [65] sú gény *HDM2* a *HDMX* spolu s génom *TP53* (kódujúcim proteín p53) alterované až v 43 % skúmaných vzoriek. *TP53* je alterovaný v 39 % skúmaných vzoriek, s najčastejším výskytom mutácií. V 3 % vzoriek bola nájdená alterácia *HDM2* a v 4 % vzoriek bola nájdená alterácia *HDMX* (obr. 2A). Zastúpenie daných alterácií sa výrazne líši podľa typu rakoviny (obr. 2B). Gén *TP53* je alterovaný výrazne v mnohých typoch rakoviny najmä skrz mutácie, s najvyšším výskytom v ovariálnom a cervikálnom karcinóme. V prípade cervikálneho karcinómu môžeme pozorovať, že amplifikácia *HDM2* a *HDMX* je takmer výnimočná. Najvýraznejšia amplifikácia *HDM2* sa vyskytuje v sarkóme mäkkých tkanív (takmer 20 %). *HDMX* je amplifikovaný najčastejšie v karcinóme prsníka (takmer 14 %).

Ďalšou príčinou zvýšenej hladiny proteínov *HDM2* a *HDMX* môže byť aj polymorfizmus jedného nukleotidu (single nucleotide polymorphism – SNP). V géne *HDM2* bol dôkladne skúmaný polymorfizmus na dvoch miestach, SNP309 a SNP285. Polymorfizmus v mieste 309 sa nachádza v prvom intróne promótoru *HDM2* P2. Promótor P2 vo variante SNP309 G/G vykazuje 2× vyššiu afinitu pre transkripčný faktor Sp1 a vedie k efektívnejšej transkripcii génu v porovnaní s formou promótoru SNP309 T/T [66]. Variant alel SNP309 G/G bol spojovaný s vyššou pravdepodobnosťou nádorových ochorení [66,67], avšak mnohé štúdie na rôznych typoch rakoviny poukazujú na nejednoznačnú spojitosť polymorfizmu SNP309 s nádorovými ochoreniami [68–71]. Naopak polymorfizmus SNP285 je spájaný s nižším výskytom rakoviny. Prítomnosť alely SNP285C potláča zvýšenú afinitu Sp1 vyvolanú variantou SNP309G [72]. Avšak táto súvislosť nebola pozorovaná napr. v karcinóme pľúc [73]. Novšie štúdie naznačujú, že vzájomné porovnanie výskytu jedného a druhého polymorfizmu v konkrétnych tkanivách a vzťahnutie výsledkov na konkrétny typ populácie môže prispieť k jednoznačnejším výsledkom [74]. V géne *HDMX* boli taktiež sledované polymorfizmy jedného nukleotidu spájané s inaktíviáciou proteínu p53, a to SNP1, SNP7, SNP9 a SNP12 [75]. Ďal-

ším študovaným polymorfizmom *HDMX* je SNP34091 A > C, avšak jednoznačné spojenie s výskytom v určitých typoch rakoviny zatiaľ nebolo preukázané [76,77].

Regulácia hladiny proteínov *HDM2* a *HDMX*

Hladina proteínov *HDM2* a *HDMX* je regulovaná na úrovni transkripcie, translácie a posttranslačných procesov. Medzi transkripčné procesy vedúce k nadmernej expresii proteínov *HDM2* a *HDMX* patrí signalizácia skrz dráhu Ras, ktorá aktivuje transkripčný faktor ETS, a ten vedie k prepisu génov *HDM2* a *HDMX* [78,79]. Na transkripčnej regulácii génu pre *HDM2* sa podieľa aj hlavný interakčný partner, proteín p53. Aktivácia proteínu p53 vedie k spusteniu transkripcie génu *HDM2*, a tak dochádza k spätnoväzbovej regulácii. *HDM2* môže opäť ubikvitinovať p53, čím zníži jeho hladinu. V prípade proteínu *HDMX* dlho nebol pozorovaný priamy vplyv proteínu p53 na transkripciu tohto génu. Neskôr bola aj u *HDMX*, tak ako predtým u *HDM2*, popísaná transkripčná aktivácia proteínom p53 z miesta druhého promótoru, na rozdiel od bazálnej transkripcie začínajúcej z prvého promótoru [20,21]. Boli popísané aj ďalšie transkripčné faktory podieľajúce sa na regulácii transkripcie *HDM2*, ako napr. IRF8, Sp1 [80].

Ako jedným z posttranskripčných procesov ovplyvňujúcich hladinu proteínov *HDM2* a *HDMX* boli popísané rôzne mikroRNA. Napríklad mir-192, mir-194 a mir-215, ktoré sú ovplyvňované proteínom p53, znižujú hladinu *HDM2* [81]. mir-34a sa viaže do miesta SNP34091 v mRNA pre *HDMX* a vedie k zníženej hladine proteínu *HDMX* [82]. Vplyv týchto interakcií však nebol zatiaľ potvrdený v *in vivo* experimentoch, a preto sú ďalšie štúdie nutné k objasneniu významu a možnému využitiu [83].

Posttranslačné modifikácie tvoria významný mechanizmus regulácie proteínov *HDM2* a *HDMX* skrz vplyv na ich stabilitu a funkciu. Dôležitú úlohu zohrávajú mnohé kinázy vedúce k fosforylácii na špecifických miestach proteínov. Medzi kinázy, ktoré vyvolávajú zvýšenú stabilitu proteínov *HDM2* a *HDMX* a následnú inaktíváciu p53, patria najmä Akt kinázy (thymomas of AKR mice)

HDM2 je fosforylovaný Akt kinázou na Ser166 a Ser186 [84], *HDMX* na Ser367 [85]. ATM kináza naopak reprezentuje fosforylačný enzým vedúci k odbúraniu proteínov *HDM2* a *HDMX*. Proteín *HDM2* je primárne fosforylovaný na Ser395 [86] a *HDMX* na Ser403 [87]. Takto fosforylované proteíny *HDM2* a *HDMX* majú zvýšenú afinitu voči p53 mRNA [15,17,88]. Fosforylácia a zároveň väzba s p53 mRNA znemožnia ich schopnosť viazať p53 proteín, a tak dochádza k aktivácii p53 dráhy [18]. Fosforylácia taktiež mení ubikvitinačnú aktivitu proteínu *HDM2*, pretože namiesto ubikvitinácie p53, proteín *HDM2* ubikvitinuje sám seba a proteín *HDMX* [18]. Fosforylácie v týchto miestach boli skúmané aj na myších modeloch a bolo ukázané, že skutočne hrajú úlohu v odpovedi na poškodenie DNA [89,90].

Z uvedených príkladov je zjavné, že hladina proteínov *HDM2* a *HDMX* je regulovaná na viacerých úrovniach. Narušenie správnej regulácie môže viesť k nadmernej expresii *HDM2* a *HDMX*. Avšak zatiaľ nie je úplne známe, akým podielom sa môžu rôzne mechanizmy účastniť na onkogénnom pôsobení *HDM2* a *HDMX*.

Využitie *HDM2* a *HDMX* v liečbe ľudských nádorov

Proteíny *HDM2* a *HDMX* sú kľúčové regulátory proteínu p53 s neprekrývajúcou sa funkciou. Zásah do regulačnej osy proteínu p53 cez tieto dva negatívne regulátory je tak prirodzenou možnosťou, ako potenciováť proteín p53 k vykonávaniu jeho protinádorovej aktivity. Vďaka dôkladnému poznaniu štruktúry a funkcie proteínov *HDM2* a *HDMX* bolo navrhnutých viacero liečebných prístupov:

1. cielenie na proteín-proteínovú interakciu medzi *HDM2*-p53 a *HDMX*-p53;
2. cielenie na zmenu transkripčnej aktivity pre gény *HDM2* a *HDMX*;
3. cielenie na ubikvitinačnú funkciu RING domény;
4. cielenie na heterodimerizáciu proteínov *HDM2* s *HDMX*;
5. cielenie na translačnú kontrolu sprostredkovanú proteínom *HDM2*.

Jeden z prvých prístupov aktivujúcich p53 dráhu skrz inhibíciu proteín-proteí-

novej interakcie medzi HDM2 bol popísaný už v roku 2004 Vassilevom et al za použitia nízkomolekulárnych látok, nutlinov [91]. Nutliny sa špecificky viažu do hydrofóbnej kapsy proteínu HDM2, a tak znemožňujú naviazanie proteínu p53. Tým dochádza k akumulácii proteínu p53, aktivácii dráhy p53, zástave bunkového cyklu a apoptóze. Tieto látky prešli aj do klinických štúdií fázy I pod názvom RG7112 alebo RO5045337 (klinické štúdie č. NCT01677780, NCT01164033, NCT01605526, NCT01143740, NCT00623870, NCT00559533, NCT01635296). Boli testované na rôznych solidných tumoroch, leukémii a i. ako monoterapia, ale aj v kombinácii s liečivami ako doxorubicin či cytarabin. Avšak bola zaznamenaná vysoká hematologická toxicita tejto látky [92]. Neskôr boli vyvinuté nutliny druhej generácie s vyššou účinnosťou a menšími vedľajšími efektmi, ako napr. idasanutlin [93]. Tieto látky boli testované ako monoterapia, ale aj ako kombinovaná liečba s inými liečivami, napr. s cisplatinou, s Poly (ADP-ribose) polymerázou (PARP) inhibítormi v preklinických štúdiách [94,95]. Pod názvom RG7388 alebo RO5503781 sú zaradené aj v klinických štúdiách fázy I a II opäť ako monoterapia alebo v kombinácii s liečivami, ako napr. obinutuzumab, idarubicin a i. (fáza I – NCT01462175, NCT01773408, NCT01901172, NCT03362723, NCT02828930, NCT02624986, NCT02633059; fáza II – NCT03287245, NCT02624986, NCT02633059). Napríklad v prípade akútnej myeloidnej leukémie (AML) pacientov bola pozorovaná dobrá znášateľnosť liečby sprevádzaná klinickou odpoveďou aj ako monoterapie, ale aj v kombinácii s cytarabinom [96]. Idasanutlin sa dostal aj do klinických testov fázy III pre pacientov s AML v kombinácii s cytarabinom (NCT 02545283).

Mnohé ďalšie liečivá využívajú stratégiu blokovania p53 väzby s proteínom HDM2. Patria sem nízkomolekulárne látky z rady spiro-oxindolov ako MI-7730, imidazothiazolov ako DS-3032b, piperidinonov ako AMG232 a mnohé ďalšie [97]. Okrem nízkomolekulárnych látok sa ako inhibítory HDM2 využívajú aj peptidy, ktoré mimikujú tri hlavné aminokyseliny p53 interaguj-

úce s HDM2 (*Phe19,Trp23,Leu26*). Takýto peptid sa špecificky viaže do hydrofóbnej kapsy p53-väzbovej domény. Na rozdiel od malých molekúl ponúka možnosť blokovat' nielen interakciu s HDM2, ale zároveň aj s HDMX [98,99]. Peptid s názvom ALRN-6924 vstúpil aj do klinických štúdií zameraných na solidné tumory, lymfómy a AML (NCT02909972, NCT02264613).

Iné prístupy aktivácie p53 dráhy skrz HDM2 a HDMX boli zatiaľ ukázané v predklinických štúdiách. Na blokovanie transkripcie génov boli popísané látky účinkujúce na expresiu HDM2 [100,101] alebo na HDMX [102]. Blokátory ubikvitinačnej aktivity proteínu HDM2 boli nájdené pomocou screeningu látok ubikvitinačným testom v bunkách a bol ukázaný ich synergistický efekt na apoptózu s DNA-poškodzujúcimi látkami [103]. Keďže HDM2 dimerizácia s HDMX stabilizuje proteín HDM2 a tým zvyšuje jeho účinnosť v ubikvitinácii p53, narušenie tejto interakcie pomocou mimikujúcich peptidov ponúka alternatívu k aktivácii signálnej dráhy p53 [104]. Schopnosť HDM2 viazať mRNA XIAP bola tiež využitá pri návrhu liečiv. HDM2 sa za normálnych podmienok viaže k mRNA XIAP, inhibítora apoptózy, a zvyšuje jeho transláciu. Pôsobením látky MX69, ktorá blokuje interakciu HDM2 s mRNA XIAP, sa zníži hladina proteínu HDM2 a taktiež translácia proteínu XIAP, stabilizuje sa proteín p53 a dochádza k zástave bunkového cyklu [105].

Záver

Proteíny HDM2 a HDMX patria medzi onkogénne proteíny. V normálnych podmienkach sú dôležitými regulátormi hladiny proteínu p53, ale hrajú aj významnú úlohu v opravách poškodenej DNA. Pri nadmernej expresii HDM2 alebo HDMX dochádza k nadmernému blokovaniu odpovede skrz p53 signálnu dráhu, čo vedie k vzniku nádorov. Zvýšená hladina proteínov HDM2 a HDMX bola pozorovaná takmer u všetkých typoch nádorov a je spojená s inaktiváciou signálnej dráhy p53 v nádoroch, ktoré si zachovávajú wild type p53. Hladina proteínov HDM2 a HDMX je zvýšená najmä skrz génovú amplifikáciu, ale bol popísaný aj vplyv polymorfizmov jedného

nukleotidu, príp. zmeny v regulácii transkripcie, posttranskripcioných procesov, translácie a posttranslačných procesov. Výskum v oblasti štruktúry proteínov HDM2 a HDMX, ich interakcie s proteínom p53 a poznanie funkcie jednotlivých domén dovolil vzniknúť mnohým prístupom k ovplyvneniu p53 dráhy. Niektoré látky vstúpili do klinických štúdií fázy I, II a III a predstavujú sľubnú možnosť liečby určitých typov rakoviny, ako napr. AML.

Literatúra

1. Karni-Schmidt O, Lokshin M, Prives C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. *Annu Rev Pathol* 2016; 11: 617–644. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040349.
2. Jones SN, Roe AE, Donehower LA et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 1995; 378(6553): 206–208. doi: 10.1038/378206a0.
3. Parant J, Chavez-Reyes A, Little NA et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet* 2001; 29(1): 92–95. doi: 10.1038/ng714.
4. Brooks CL, Gu W. p53 regulation by ubiquitin. *FEBS Lett* 2011; 585(18): 2803–2809. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.022.
5. Wang X. p53 regulation: teamwork between RING domains of Mdm2 and MdmX. *Cell Cycle* 2011; 10(24): 4225–4229. doi: 10.4161/cc.10.24.18662.
6. Wang X, Wang J, Jiang X. MdmX protein is essential for Mdm2 protein-mediated p53 polyubiquitination. *J Biol Chem* 2011; 286(27): 23725–23734. doi: 10.1074/jbc.M110.213868.
7. Chen J, Lin J, Levine AJ. Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol Med* 1995; 1(2): 142–152.
8. Thut CJ, Goodrich JA, Tjian R. Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev* 1997; 11(15): 1974–1986.
9. Itahana K, Mao H, Jin A et al. Targeted inactivation of Mdm2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. *Cancer Cell* 2007; 12(4): 355–366. doi: 10.1016/j.ccr.2007.09.007.
10. Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N et al. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J* 1996; 15(19): 5349–5357.
11. Shimizu H, Burch LR, Smith AJ et al. The conformationally flexible S9-S10 linker region in the core domain of p53 contains a novel MDM2 binding site whose mutation increases ubiquitination of p53 *in vivo*. *J Biol Chem* 2002; 277(32): 28446–28458. doi: 10.1074/jbc.M202296200.
12. Yu GW, Rudiger S, Veprintsev D et al. The central region of HDM2 provides a second binding site for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(5): 1227–1232. doi: 10.1073/pnas.0510343103.
13. Wei X, Wu S, Song T et al. Secondary interaction between MDMX and p53 core domain inhibits p53 DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(19): E2558–E2563. doi: 10.1073/pnas.1603838113.
14. Medina-Medina I, Martinez-Sanchez M, Hernandez-Monge J et al. p53 promotes its own polyubiquitination by enhancing the HDM2 and HDMX interaction. *Protein Sci* 2018; 27(5): 976–986. doi: 10.1002/pro.3405.

15. Malbert-Colas L, Ponnuswamy A, Olivares-Illana V et al. HDMX folds the nascent p53 mRNA following activation by the ATM kinase. *Mol Cell* 2014; 54(3): 500–511. doi: 10.1016/j.molcel.2014.02.035.
16. Candeias MM, Malbert-Colas L, Powell DJ et al. p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat Cell Biol* 2008; 10(9): 1098–1105. doi: 10.1038/ncb1770.
17. Gajjar M, Candeias MM, Malbert-Colas L et al. The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer Cell* 2012; 21(1): 25–35. doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.016.
18. Medina-Medina I, Garcia-Beltran P, de la Mora-de la Mora I et al. Allosteric interactions by p53 mRNA govern HDM2 E3 ubiquitin ligase specificity under different conditions. *Mol Cell Biol* 2016; 36(16): 2195–2205. doi: 10.1128/MCB.00113-16.
19. Ponnuswamy A, Hupp T, Fahraeus R. Concepts in MDM2 signaling: allosteric regulation and feedback loops. *Genes Cancer* 2012; 3(3–4): 291–297. doi: 10.1177/1947601912454140.
20. Phillips A, Teunisse A, Lam S et al. HDMX-L is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the HDMX gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity. *J Biol Chem* 2010; 285(38): 29111–29127. doi: 10.1074/jbc.M110.129726.
21. Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T et al. Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 1994; 8(15): 1739–1749.
22. Zhang Y, Xiong Y. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ* 2001; 12(4): 175–186.
23. Ghosh M, Weghorst K, Berberich SJ. MdmX inhibits ARF mediated Mdm2 sumoylation. *Cell Cycle* 2005; 4(4): 604–608.
24. Jackson MW, Lindstrom MS, Berberich SJ. MdmX binding to ARF affects Mdm2 protein stability and p53 transactivation. *J Biol Chem* 2001; 276(27): 25336–25341. doi: 10.1074/jbc.M010685200.
25. Nag S, Qin J, Srivenugopal KS et al. The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res* 2013; 27(4): 254–271. doi: 10.7555/JBR.27.20130030.
26. Ferreón JC, Lee CW, Arai M et al. Cooperative regulation of p53 by modulation of ternary complex formation with CBP/p300 and HDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(16): 6591–6596. doi: 10.1073/pnas.0811023106.
27. Sabbatini P, McCormick F. MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. *DNA Cell Biol* 2002; 21(7): 519–525. doi: 10.1089/104454902320219077.
28. Eischen CM. Role of Mdm2 and Mdmx in DNA repair. *J Mol Cell Biol* 2017; 9(1): 69–73. doi: 10.1093/jmcb/mjw052.
29. Gu L, Zhu N, Zhang H et al. Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation. *Cancer Cell* 2009; 15(5): 363–375. doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.002.
30. Jung CH, Kim J, Park JK et al. Mdm2 increases cellular invasiveness by binding to and stabilizing the Slug mRNA. *Cancer Lett* 2013; 335(2): 270–277. doi: 10.1016/j.canlet.2013.02.035.
31. Gu L, Zhang H, He J et al. MDM2 regulates MYCN mRNA stabilization and translation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2012; 31(11): 1342–1353. doi: 10.1038/onc.2011.343.
32. Zhou S, Gu L, He J et al. MDM2 regulates vascular endothelial growth factor mRNA stabilization in hypoxia. *Mol Cell Biol* 2011; 31(24): 4928–4937. doi: 10.1128/MCB.06085-11.
33. Bottger V, Bottger A, Garcia-Echeverria C et al. Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene* 1999; 18(1): 189–199. doi: 10.1038/sj.onc.1202281.
34. Popowicz GM, Czarna A, Holak TA. Structure of the human Mdmx protein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Cell Cycle* 2008; 7(15): 2441–2443. doi: 10.4161/cc.6365.
35. Miller KR, Kelley K, Tuttle R et al. HdmX overexpression inhibits oncogene induced cellular senescence. *Cell Cycle* 2010; 9(16): 3376–3382. doi: 10.4161/cc.9.16.12779.
36. Bista M, Petrovich M, Fersht AR. MDMX contains an autoinhibitory sequence element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(44): 17814–17819. doi: 10.1073/pnas.1317398110.
37. Kawai H, Wiederschain D, Yuan ZM. Critical contribution of the MDM2 acidic domain to p53 ubiquitination. *Mol Cell Biol* 2003; 23(14): 4939–4947.
38. Meulmeester E, Frenk R, Stad R et al. Critical role for a central part of Mdm2 in the ubiquitylation of p53. *Mol Cell Biol* 2003; 23(14): 4929–4938.
39. Huang Q, Chen L, Yang L et al. MDMX acidic domain inhibits p53 DNA binding *in vivo* and regulates tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(15): E3368–E3377. doi: 10.1073/pnas.1719090115.
40. Manfredi JJ. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes Dev* 2010; 24(15): 1580–1589. doi: 10.1101/gad.1941710.
41. Lindstrom MS, Deisenroth C, Zhang Y. Putting a finger on growth surveillance: insight into MDM2 zinc finger-ribosomal protein interactions. *Cell Cycle* 2007; 6(4): 434–437. doi: 10.4161/cc.6.4.3861.
42. Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A et al. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(21): 12009–12014. doi: 10.1073/pnas.2030930100.
43. Stevens C, Pettersson S, Wawrzynow B et al. ATP stimulates MDM2-mediated inhibition of the DNA-binding function of E2F1. *FEBS J* 2008; 275(19): 4875–4886. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06227.x.
44. Priest C, Prives C, Poyurovsky MV. Deconstructing nucleotide binding activity of the Mdm2 RING domain. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(21): 7587–7598. doi: 10.1093/nar/gkq669.
45. Liu T, Zhang H, Xiong J et al. Inhibition of MDM2 homodimerization by XIAP IRES stabilizes MDM2, influencing cancer cell survival. *Mol Cancer* 2015; 14: 65. doi: 10.1186/s12943-015-0334-0.
46. Jacob AG, Singh RK, Comiskey DF Jr. et al. Stress-induced alternative splice forms of MDM2 and MDMX modulate the p53-pathway in distinct ways. *PLoS One* 2014; 9(8): e104444. doi: 10.1371/journal.pone.0104444.
47. Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U et al. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* 1987; 13(3): 235–244.
48. Momand J, Zambetti GP, Olson DC et al. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69(7): 1237–1245.
49. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358(6381): 80–83. doi: 10.1038/358080a0.
50. Forus A, Florenes VA, Maelandsmo GM et al. Mapping of amplification units in the q13-14 region of chromosome 12 in human sarcomas: some amplicons do not include MDM2. *Cell Growth Differ* 1993; 4(12): 1065–1070.
51. Ladanyi M, Cha C, Lewis R et al. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 1993; 53(1): 16–18.
52. Leach FS, Tokino T, Meltzer P et al. p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993; 53(Suppl 10): 2231–2234.
53. Miller CW, Aslo A, Won A et al. Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122(9): 559–565.
54. Patterson H, Barnes D, Gill S et al. Amplification and over-expression of the MDM2 gene in human soft tissue tumours. *Sarcoma* 1997; 1(1): 17–22. doi: 10.1080/13577149778434.
55. Reifenberger G, Liu L, Ichimura K et al. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 1993; 53(12): 2736–2739.
56. Quesnel B, Preudhomme C, Fournier J et al. MDM2 gene amplification in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1994; 30A(7): 982–984.
57. Marchetti A, Buttitta F, Girlando S et al. mdm2 gene alterations and mdm2 protein expression in breast carcinomas. *J Pathol* 1995; 175(1): 31–38. doi: 10.1002/path.1711750106.
58. Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S et al. Mdm2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations. *Diagn Mol Pathol* 1995; 4(2): 93–97.
59. Riemenschneider MJ, Buschges R, Wolter M et al. Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res* 1999; 59(24): 6091–6096.
60. Bartel F, Schulz J, Bohnke A et al. Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. *Int J Cancer* 2005; 117(3): 469–475. doi: 10.1002/ijc.21206.
61. Haupt S, Vijayakumaran R, Miranda PJ et al. The role of MDM2 and MDM4 in breast cancer development and prevention. *J Mol Cell Biol* 2017; 9(1): 53–61. doi: 10.1093/jmcb/mjx007.
62. Miranda PJ, Buckley D, Raghu D et al. MDM4 is a rational target for treating breast cancers with mutant p53. *J Pathol* 2017; 241(5): 661–670. doi: 10.1002/path.4877.
63. Laurie NA, Donovan SL, Shih CS et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 2006; 444(7115): 61–66. doi: 10.1038/nature05194.
64. Oliner JD, Saiki AY, Caenepeel S. The role of MDM2 amplification and overexpression in tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6(6): pii: a026336. doi: 10.1101/cshperspect.a026336.
65. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012; 2(5): 401–404. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
66. Bond GL, Hu W, Bond EE et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 2004; 119(5): 591–602. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.022.
67. Hu Z, Jin G, Wang L et al. MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: evidence from 21 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(12): 2717–2723. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0634.
68. Economidou KP, Sergentanis TN. Differential effects of MDM2 SNP309 polymorphism on breast cancer risk along with race: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120(1): 211–216. doi: 10.1007/s10549-009-0467-1.
69. Wilkening S, Bermejo JL, Hemminki K. MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis. *Carcinogenesis* 2007; 28(11): 2262–2267. doi: 10.1093/carcin/bgm191.
70. Krekac D, Brozkova K, Knoflickova D et al. MDM2S NP309 does not associate with elevated MDM2 protein expression or breast cancer risk. *Oncology* 2008; 74(1–2): 84–87. doi: 10.1159/000139135.
71. Wilkening S, Hemminki K, Rudnai P et al. No association between MDM2 SNP309 promoter polymorphism and basal cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol*

- 2007; 157(2): 375–377. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07994.x
72. Knappskog S, Bjornstlett M, Myklebust LM et al. The MDM2 promoter SNP285C/309G haplotype diminishes Sp1 transcription factor binding and reduces risk for breast and ovarian cancer in Caucasians. *Cancer Cell* 2011; 19(2): 273–282. doi: 10.1016/j.ccr.2010.12.019.
73. Ryan BM, Calhoun KM, Pine SR et al. MDM2 SNP285 does not antagonize the effect of SNP309 in lung cancer. *Int J Cancer* 2012; 131(11): 2710–2716.
74. Wang P, Wang M, Li S et al. Association of the MDM2 SNP285 polymorphism with cancer susceptibility: a meta-analysis. *Dis Markers* 2016; 2016: 4585484. doi: 10.1155/2016/4585484.
75. Atwal GS, Kirchhoff T, Bond EE et al. Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(25): 10236–10241. doi: 10.1073/pnas.0901298106.
76. Gansmo LB, Romundstad P, Birkeland E et al. MDM4 SNP34091 (rs4245739) and its effect on breast-, colon-, lung-, and prostate cancer risk. *Cancer Med* 2015; 4(12): 1901–1907. doi: 10.1002/cam4.555.
77. Gansmo LB, Bjornstlett M, Halle MK et al. The MDM4 SNP34091 (rs4245739) C-allele is associated with increased risk of ovarian-but not endometrial cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(8): 10697–10702. doi: 10.1007/s13277-016-4940-2.
78. Gilkes DM, Pan Y, Coppola D et al. Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* 2008; 28(6): 1999–2010. doi: 10.1128/MCB.01633-07.
79. Ries S, Biederer C, Woods D et al. Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* 2000; 103(2): 321–330.
80. Wade M, Li YC, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(2): 83–96. doi: 10.1038/nrc3430.
81. Pichiorri F, Suh SS, Rocci A et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 2010; 18(4): 367–381. doi: 10.1016/j.ccr.2010.09.005.
82. Mandke P, Wyatt N, Fraser J et al. MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame. *PLoS One* 2012; 7(8): e42034. doi: 10.1371/journal.pone.0042034.
83. Concepcion CP, Han YC, Mu P et al. Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice. *PLoS Genet* 2012; 8(7): e1002797. doi: 10.1371/journal.pgen.1002797.
84. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(20): 11598–11603. doi: 10.1073/pnas.181181198.
85. Lopez-Pajares V, Kim MM, Yuan ZM. Phosphorylation of MDMX mediated by Akt leads to stabilization and induces 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 2008; 283(20): 13707–13713. doi: 10.1074/jbc.M710030200.
86. Maya R, Balass M, Kim ST et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 2001; 15(9): 1067–1077. doi: 10.1101/gad.886901.
87. Chen L, Gilkes DM, Pan Y et al. ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J* 2005; 24(19): 3411–3422. doi: 10.1038/sj.emboj.7600812.
88. Naski N, Gajjar M, Bourougaa K et al. The p53 mRNA-Mdm2 interaction. *Cell Cycle* 2009; 8(1): 31–34. doi: 10.4161/cc.8.1.7326.
89. Gannon HS, Woda BA, Jones SN. ATM phosphorylation of Mdm2 Ser394 regulates the amplitude and duration of the DNA damage response in mice. *Cancer Cell* 2012; 21(5): 668–679. doi: 10.1016/j.ccr.2012.04.011.
90. Wang YV, Leblanc M, Wade M et al. Increased radioresistance and accelerated B cell lymphomas in mice with Mdmx mutations that prevent modifications by DNA-damage-activated kinases. *Cancer Cell* 2009; 16(1): 33–43. doi: 10.1016/j.ccr.2009.05.008.
91. Vassilev LT, Vu BT, Graves B et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; 303(5659): 844–848. doi: 10.1126/science.1092472.
92. Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A et al. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol* 2012; 13(11): 1133–1140. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70474-6.
93. Ding Q, Zhang Z, Liu JJ et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J Med Chem* 2013; 56(14): 5979–5983. doi: 10.1021/jm400487c.
94. Zanjirband M, Curtin N, Edmondson RJ et al. Combination treatment with rucaparib (Rubraca) and MDM2 inhibitors, Nutlin-3 and RG7388, has synergistic and dose reduction potential in ovarian cancer. *Oncotarget* 2017; 8(41): 69779–69796. doi: 10.18632/oncotarget.19266.
95. Zanjirband M, Edmondson RJ, Lunec J. Pre-clinical efficacy and synergistic potential of the MDM2-p53 antagonists, Nutlin-3 and RG7388, as single agents and in combined treatment with cisplatin in ovarian cancer. *Oncotarget* 2016; 7(26): 40115–40134. doi: 10.18632/oncotarget.9499.
96. Reis B, Jukofsky L, Chen G et al. Acute myeloid leukemia patients' clinical response to idasanutlin (RG7388) is associated with pre-treatment MDM2 protein expression in leukemic blasts. *Haematologica* 2016; 101(5): e185–e188. doi: 10.3324/haematol.2015.139717.
97. Burgess A, Chia KM, Haupt S et al. Clinical overview of MDM2/X-targeted therapies. *Front Oncol* 2016; 6: 7. doi: 10.3389/fonc.2016.00007.
98. Chang YS, Graves B, Guerlavais V et al. Stapled alpha-helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(36): E3445–E3454. doi: 10.1073/pnas.1303002110.
99. Madden MM, Muppidi A, Li Z et al. Synthesis of cell-permeable stapled peptide dual inhibitors of the p53-Mdm2/Mdmx interactions via photoinduced cycloaddition. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(5): 1472–1475. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.01.004.
100. Huang M, Zhang H, Liu T et al. Triptolide inhibits MDM2 and induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells through a p53-independent pathway. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(2): 184–194. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0425.
101. Qin JJ, Wang W, Voruganti S et al. Inhibiting NFAT1 for breast cancer therapy: New insights into the mechanism of action of MDM2 inhibitor JapA. *Oncotarget* 2015; 6(32): 33106–33119. doi: 10.18632/oncotarget.5851.
102. Wang H, Ma X, Ren S et al. A small-molecule inhibitor of MDMX activates p53 and induces apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(1): 69–79. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0581.
103. Herman AG, Hayano M, Poyurovsky MV et al. Discovery of Mdm2-MdmX E3 ligase inhibitors using a cell-based ubiquitination assay. *Cancer Discov* 2011; 1(4): 312–325. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0104.
104. Pellegrino M, Mancini F, Luca R et al. Targeting the MDM2/MDM4 interaction interface as a promising approach for p53 reactivation therapy. *Cancer Res* 2015; 75(21): 4560–4572. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0439.
105. Gu L, Zhang H, Liu T et al. Discovery of dual inhibitors of MDM2 and XIAP for cancer treatment. *Cancer Cell* 2016; 30(4): 623–636. doi: 10.1016/j.ccell.2016.08.015.

Prima-1 a APR-246 v léčbě nádorových onemocnění

Prima-1 and APR-246 in Cancer Therapy

Zatloukalová P., Galoczová M., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Nejčastěji mutovaným proteinem u nádorových onemocnění je p53 a jednou z možností protinádorové terapie je reaktivace jeho neaktivní mutované formy. Cílem reaktivací je nastartování apoptózy a potlačení maligního fenotypu. Látkou schopnou reaktivovat mutantní p53 je Prima-1 nebo její metylovaná forma Prima-1^{Met} (označovaná také jako APR-246). Jedná se o nízkomolekulární látky, které byly testovány u řady nádorových buněčných linií, ale i na samotných nádorech nesoucích mutantní p53. **Cíl:** Cílem článku je shrnout dosavadní poznatky o mechanismu působení Prima-1 a APR-246, popsat jejich využití v protinádorové terapii a zároveň shrnout výsledky klinických studií, jimiž APR-246 aktuálně prochází. **Závěr:** Z dosavadních experimentů vzešla řada protichůdných výsledků upozorňujících na fakt, že mechanismus účinku látek není stále zcela objasněn. S určitostí jen víme, že Prima-1 i APR-246 indukuje apoptózu nádorových buněk. Specifita látek k mutantnímu p53 je však velmi variabilní a odvíjí se především od použitého buněčného modelu a typu mutace. Kromě samotné reaktivace p53 jsou pravděpodobně ovlivněny i další buněčné mechanismy, které cytotoxický účinek látek modifikují.

Klíčová slova

Prima-1 (MET) – APR-246 – Prima-1 – reaktivace p53 – apoptóza

Summary

Background: p53 is the most mutated protein in cancer and the reactivation of its inactive mutated form represents one possibility for antitumor therapy. Reactivation leads to the initiation of apoptosis followed by the suppression of the malignant phenotype. Prima-1 and its methylated form Prima-1^{Met} (also called APR-246) are compounds capable of reactivating mutated p53. Both are low-molecular substances that have been tested in a number of tumor cell lines and tumors bearing mutated p53. **Aim:** This article summarizes what is currently known about both compounds, describes the possibilities of their use in anti-tumor therapy, and outlines the results of currently undergoing clinical trials of APR-246. **Conclusion:** The results show that the mechanism of action of both compounds is still not clear. The mechanism is only known clearly in the case of Prima-1, and APR-246 is only known to induce apoptosis. The specificity of both substances for mutated p53 differs considerably and depends mainly on the cell model employed and the type of mutation. In addition to p53 reactivation itself, these compounds likely influence other mechanisms that also affect cytotoxic activity.

Key words

Prima-1^{Met} – APR-246 – Prima-1 – reactivation of p53 – apoptosis

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Pavlína Zatloukalová, Ph.D.

Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: pavlina.zatloukalova@mou.cz

Přijato/Accepted: 16. 07. 2018

doi: 10.14735/amko20182571

Úvod

Protein p53 je nádorový supresor, jehož klíčovou funkcí je regulace buněčného cyklu a apoptózy v odpovědi na různé druhy buněčného stresu. Jako „strážce genomu“ zamezuje kumulaci mutací, a tím přispívá k omezení vzniku maligního fenotypu. U téměř poloviny nádorových onemocnění dochází k mutacím *TP53*. Sekvenováním exomů více než 3 000 vzorků u 12 nejčastěji se vyskytujících lidských nádorů byla zjištěna přítomnost mutace *TP53* u 42 % analyzovaných vzorků, nejčastěji pak u karcinomu vaječníku a endometria, nejméně naopak u karcinomu ledvin [1]. U nádorů s velmi špatnou prognózou, jako jsou „high-grade“ serózní karcinom vaječníku, triple negativní karcinom prsu, nádor jícnu či plic se uvádí přítomnost mutované formy p53 (p53mut) dokonce až v 80 % případů [2]. Nádory s p53mut jsou obvykle charakterizovány horší prognózou, zvýšenou invazivitou a metastazováním.

Nejčastějším typem mutací *TP53* jsou bodové mutace, které mění smysl kodonu a jejichž výsledkem je substituce jedné aminokyseliny za jinou. Téměř 90 % z nich je lokalizováno v DNA vazebné doméně p53 [3], kde přispívají k nesprávnému sbalování proteinu, znemožňují jeho vazbu na DNA cílových genů a omezují tak jeho nádorově supresorovou funkci v buňce [4]. Nemutovaná forma p53 (p53wt) se v normálních buňkách vyskytuje ve velmi nízkých hladinách, a to z důvodu regu-

lované degradace E3-ubikvitin ligázou MDM2. Naopak v případě p53mut je interakce s MDM2 narušená a vede k jeho omezené degradaci a kumulaci v buňkách [5]. p53mut může navíc získat nové onkogenní vlastnosti přispívající k přežití nádorových buněk nebo ke vzniku rezistence k chemoterapii [6].

V současné době je vyvíjeno značné úsilí získat nové látky specificky se vázající na p53mut, schopné vyvolat buněčnou apoptózu či podpořit další mechanismy potlačující růst a proliferaci buněk nebo alespoň zvýšit citlivost buněk k chemoterapeutikům. Mezi látky, které byly již v minulosti testovány a jejichž antiproliferativní účinek je spojen s reaktivací p53, patří např. MIRA-1 [7], CP 31398 [8], PhiKan083 [9], ale také Prima-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) a APR-246 [10,11].

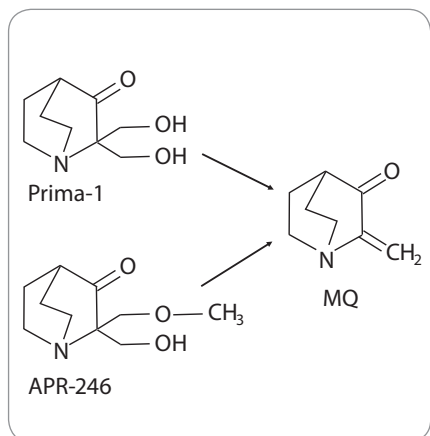
Mechanismus působení Prima-1 a APR-246

Prima-1 byla identifikována v roce 2002 v rámci screeningu knihovny nízkomolekulárních látek amerického Národního onkologického institutu (National Cancer Institute – NCI). Jeho cílem bylo nalézt látky schopné změnit nefunkční konformaci p53mut na funkční p53wt a tím reaktivovat funkci p53 jako nádorového supresoru schopného potlačit růst nádorů [12]. Chemicky se jedná o 2,2-bis(hydroxymethyl)-1-azabicyklo[2,2,2]oktan-3-on (obr. 1) [10,12]. Analýzou strukturálních analogů byla poté odhalena metylovaná forma označující se jako Prima-1^{Met} neboli APR-246, chemicky 2-hydroxymethyl-2-methoxymethyl-aza-bicyklo[2,2,2]oktan-3-on (obr. 1). Biologická aktivita obou sloučenin je dána konverzí na methylen quinuclidinon (MQ), ke které dochází spontánně při fyziologickém pH (obr. 1) [13]. Jeho struktura obsahuje dvojnou vazbu udělující MQ slabé elektrofilní vlastnosti a umožňující mu fungovat jako Michaelův akceptor, tzn. preferenčně interagovat se slabými nukleofily. Slabé nukleofily jsou v buněčném prostředí zastoupeny zejména thiolovými skupinami na cysteinech obsažených ve strukturách proteinů či redoxních regulátorů. V případě p53 se MQ kova-

lentně váže na centrální část proteinu, která obsahuje 10 cysteinových reziduí [13]. Počítačovou analýzou strukturálních modelů p53 byla identifikována vazebná kapsa obsahující cysteiny Cys124, Cys135 a Cys141 [14]. *In vitro* studie pak prokázaly, že primární roli při reaktivaci p53mut pomocí Prima-1 hraje alkylace Cys124 [14], která je spouštěčem alkylace ostatních cysteinů destabilizovaného p53, které jej nakonec termodynamicky uvězní v transkripčně aktivní konformaci [15] a navrátí mu schopnost transaktivovat cílové geny. Vazbou MQ na Cys277 a Cys124 dochází k reaktivaci p53 nesoucího mutaci v R175H. Alkylace pouze Cys277 zvyšuje termostabilitu p53wt a p53 nesoucích mutace R175H a R273H [16]. Dále bylo zjištěno, že Prima-1 zvyšuje expresi chaperonu Hsp90α, který také může napomáhat správnému sbalování p53 [17].

In vitro a *in vivo* studie u různých nádorových modelů prokázaly schopnost Prima-1 i APR-246 indukovat apoptózu [18–20] a zástavu buněčného cyklu [19,20]. Větší cytotoxicitu obecně vykazuje APR-246, a to především díky vyšší lipofilitě a schopnosti lépe penetrovat buněčnou membránou [11,21]. Reaktivace p53 pomocí Prima-1 či APR-246 byla studována především v souvislosti s bodovými mutacemi měnícími smysl kodonu. Reaktivací obou látek byl ale také prokázán u buněčných linií s *TP53* nesoucích bodové mutace vedoucí ke vzniku zkrácených forem proteinu či mutace způsobující posun čtecího rámce [22]. V současné době se objevují studie upozorňující na cytotoxický efekt obou látek u buněčných linií s deletovanou či nemutovanou formou p53, tzn. na cytotoxický efekt nezávislý na mutaci v p53 [22–24].

Reaktivace p53 způsobuje indukci apoptózy prostřednictvím vnitřní mitochondriální dráhy, a to regulací pro-apoptotických a anti-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2. Řada publikací popsala reaktivaci apoptózy indukovanou Prima-1 nebo APR-246, avšak s rozdílnými výsledky v expresi pro-apoptotických proteinů PUMA, BAX a APAF-1. U plicních buněčných linií APR-246 indukovala zvýšení aktivace kaspázy-2 a zvýšení exprese PUMA a BAX [25]. V jiné studii bylo prokázáno, že APR-246 indukuje



Obr. 1. Chemická struktura Prima-1 a APR-246 a jejich spontánní konverze na methylen quinuclidinon (MQ).

expresi proteinů APAF-1 a PUMA, nikoli však BAX [26]. Naopak indukce apoptózy po expozici Prima-1 nebo APR-246 nebyla zjištěna u nemalobuněčného karcinomu plic (non-small-cell lung cancer – NSCLC) [27], rakoviny prostaty [28] nebo sarkomu měkkých tkání [29]. V této souvislosti nebyly u p53wt ani p53mut detekovány změny buněčného cyklu [27,28], přítomnost apoptotických tělísek [28] ani nedocházelo ke štěpení PARP [27,29], které by jinak poukazovalo na aktivaci apoptotických mechanismů. U nádorových linií sarkomu měkkých tkání bylo zjištěno, že APR-246 aktivuje signální dráhu JNK [29] a tím spouští apoptózu v závislosti na mutantním stavu p53 u buněčných linií odvozených od nádorů tlustého střeva [30]. V protikladu k těmto studiím bylo ovšem také publikováno, že indukce apoptózy je podmíněna inhibicí signální dráhy JNK u linií odvozených od nádorů prsu [31]. Rozdílné výsledky tedy upozorňují na nejasnosti v mechanismu účinku Prima-1 i APR-246 a poukazují na možnou přítomnost dalších elementů či mechanismů, které by mohly ovlivňovat jejich cytotoxickou aktivitu.

Procesy indukované Prima-1 nebo APR-246 nezávislé na přítomnosti p53mut

Jak bylo zmíněno výše, cytotoxicita APR-246 i Prima-1 se může projevit bez ohledu na přítomnost p53mut. Mimo reaktivaci p53mut mají Prima-1 i APR-246 schopnost aktivovat procesy vedoucí k indukci apoptózy, které jsou však na p53 proteinu nezávislé (schéma 1). APR-246 je inhibitorem thioredoxin reduktázy (TrxR1), enzymu katalyzujícího redukci thioredoxinu. MQ se váže na selenocysteiny obsažené ve struktuře TrxR1, čímž mění jeho funkci z reduktázy na NADPH oxidázu vedoucí ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a tím k indukci apoptózy [23]. Inaktivace TrxR1 může být podpořena společným použitím APR-246 a inhibitorů PARP-1 [32]. MQ se také může vázat na cysteiny glutationu a tím snížit jeho intracelulární hladinu a podpořit vznik ROS [33]. Zvýšená hladina ROS následně indukuje autofagii, jak bylo prokázáno

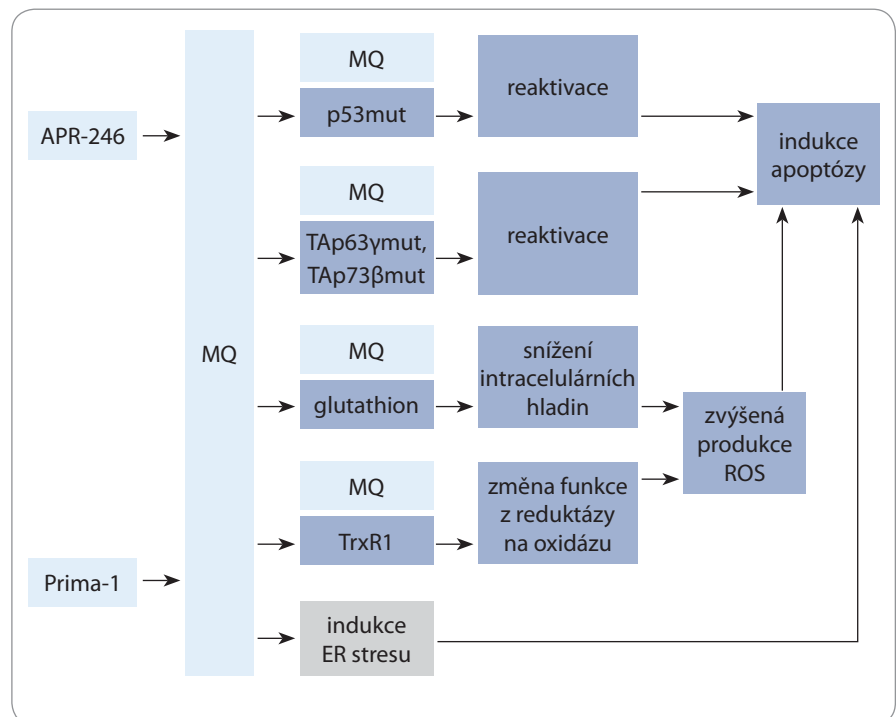


Schéma 1. Procesy indukované Prima-1 a APR-246 vedoucí k indukci apoptózy.

MQ – methylen quinuclidinon, TrxR1 – inhibitor thioredoxin reduktázy, ROS – reaktivní formy kyslíku, ER – stres endoplazmatického retikula

u nádorových buněk exprimujících p53mut i p53wt [34]. Dále bylo zjištěno, že p53 vykazuje modulační efekt na autofagii vyvolanou Prima-1 u buněk s p53wt. Prima-1 omezuje autofagii, zatímco v přítomnosti p53mut autofagii spouští a podporuje [34]. Proteomická analýza navíc ukázala, že kromě proteinů vnitřní mitochondriální apoptotické dráhy jsou do mechanismu působení Prima-1 zapojeny také proteiny anaerobní glykolýzy [35], které naopak mohou napomáhat nádorovým buňkám bránit se apoptotickým signálům.

Dalším mechanismem přispívajícím k cytotoxicitě Prima-1 je stres endoplazmatického retikula, tzv. UPR (unfolded protein response) (schéma 1). K aktivaci UPR dochází při kumulaci chybně sbalených proteinů. Buňka se snaží obnovit normální stav tím, že degraduje tyto proteiny a zároveň zvyšuje expresi molekulárních chaperonů. V případě selhání těchto regulačních mechanismů je spuštěna apoptóza. Prima-1 zvyšuje expresi chaperonů, a to zejména proteinů teplošokového šoku Hsp70 [24] a Hsp90 [17]. Zvyšuje expresi CHOP [24], který spouští apoptózu indukovanou UPR [36]. Navíc

bylo potvrzeno, že deplece CHOP výrazně snižuje cytotoxicitu Prima-1 [24].

Přestože je APR-246 nejčastěji zmiňovaná v souvislosti s reaktivací p53, její efekt byl prokázán rovněž u ostatních členů proteinové rodiny p53 (p63 a p73). Proteiny rodiny p53 sdílejí stejnou organizační strukturu zahrnující N-terminální transaktivační doménu, DNA-vazebnou doménu a C-terminální oligomerizační doménu. Díky částečné homologii v oligomerizační doméně mohou tvořit heterotetramery a vysoká homologie v DNA-vazebné doméně indikuje jejich schopnost vázat se také na stejné cílové geny. Všechny geny kódující proteiny rodiny p53 exprimují řadu izoform. Díky existenci alternativních promotorů či počátků translace vznikají N-koncově zkrácené izoformy, díky různým místům sestřihu pak C-koncově zkrácené izoformy. N-koncově nezkrácené izoformy TAp63 a TAp73 pak vykazují největší homologii s p53 a rovněž se uplatňují v indukci apoptózy a zůstávají buněčného cyklu [37]. Na rozdíl od TP53 hrají TP63 a TP73 roli zejména v ontogenezi a v nádorech jsou mutovány jen velmi zřídka [38]. Mutace v TP63 jsou

např. hlavní příčinou EEC (ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting) syndromu, charakteristického ektoaktylií, ektoaktylií a rozštěpy rtu nebo patra. APR-246 je schopná reaktivovat R240W a R304W mutantní formy TAp63γ, které odpovídají hot-spot mutacím R175H a R273H p53, a to u keratinocytů [39] a také u indukovaných pluripotentních buněk pacientů s EEC syndromem [40]. Dále bylo zjištěno, že APR-246 je schopná obnovit pro-apoptickou funkci mutantních forem TAp63γ a TAp73β u nádorových buněk [41]. APR-246 může navíc indukovat p73-dependentní apoptózu bez ohledu na mutaci p53 [42].

Cytotoxicita a terapeutické využití Prima-1 a APR-246

Distribuce látky do jednotlivých orgánů byla testována pomocí intravenózní aplikace radioaktivně značené Prima-1. Bylo zjištěno, že Prima-1 není schopná překonávat hemoencefalickou bariéru, akumuluje se ale v ledvinách a je vylučována močí [43].

Prima-1 i APR-246 byly testovány u řady lidských malignit a cytotoxický účinek se lišil v závislosti na použité nádorové linii či nádoru (IC_{50} v rozmezí 0,75–200 μl) [44]. Rozdílná cytotoxicita APR-246 byla pozorována u buněčných linií nesoucích stejnou mutaci v p53, ale i u vzorků získaných ze stejného nádoru, ale v různých fázích histopatologické diferenciace (odlišný „grading“) [18]. Cytotoxický účinek APR-246 se neprojevil u vzorků získaných od pacientů s chronickou B lymfocytární leukémií (B CLL) nesoucích hemizygotní delece v *TP53* [45]. Omezený nebo téměř žádný cytotoxický efekt Prima-1 nebyl pozorován u nenádorových buněk krve [42,45] a fibroblastů [11,46].

Cytotoxická aktivita APR-246 byla testována *in vitro* a *ex vivo* v rámci mnoha studií, a to samostatně nebo v kombinaci s běžně používanými cytostatiky. V léčbě řady karcinomů se uplatňují sloučeniny platiny, které vytvářejí kovalentní vazby s purinovými bázemi v DNA, čímž omezují její replikaci a aktivují signální dráhu p53. Bylo zjištěno, že APR-246 obnovuje citlivost k cisplatině u buněk získaných z high-grade serózních ovariálních

(HGSO) karcinomů nesoucích rezistenci k cisplatině [47,48]. Synergický efekt APR-246 a cisplatin byl pozorován u nádorových buněk získaných z ascitu HGSO karcinomů nesoucích v DNA-vazebné doméně mutaci v p53 měnící smysl kodonu, ale i u vzorků nesoucích p53wt nebo zkrácenou formu p53 [48]. Synergický efekt Prima-1 anebo APR-246 s cisplatinou byl dále zjištěn u buněčných linií kolorektálního karcinomu [11], adenokarcinomu plic [11], karcinomu hlavy a krku [46] a karcinomu slinivky břišní [49]. Na xenogenním modelu *in vivo* karcinomu plic [7], jícnu [22] a vaječnicku [47] byl také potvrzen synergický účinek Prima-1 nebo APR-246 a cisplatin. Další látkou znemožňující replikaci DNA vazbou na oba řetězce (interkalací) nebo inhibicí topoizomerázy II je doxorubicin. Synergický efekt s Prima-1 nebo APR-246 *in vitro* a *ex vivo* byl pozorován u karcinomu vaječnicku [47,48], štítné žlázy [50], slinivky břišní [49], prsu [17] a mnohočetného myelomu [42]. V současné době je APR-246 testována v kombinaci s karboplatinou a pegylovaným lipozomálním doxorubicinem v klinické studii fáze Ib/II u HGSO karcinomu (NCT02098343, NCT03268382). V klinické studii NCT0299989 fáze Ib/II je APR-246 testována v kombinaci s cisplatinou a 5-fluorouracilem při léčbě pokročilého a metastazujícího karcinomu jícnu s mutací v p53.

Další látkou testovanou v kombinaci s APR-246 je olaparib, který se řadí do skupiny inhibitorů PARP regulujících reparaci poškozené DNA. Vyřazením mechanismu opravy dochází ke zvýšení citlivosti nádorových buněk k léčbě. Silný synergický efekt s APR-246 byl pozorován u NSCLC, a to bez ohledu na přítomnost mutace v p53 [51]. APR-246 navíc zvýšila citlivost k olaparibu u buněk s p53mut, které byly k olaparibu rezistentní [51]. Synergický efekt s olaparibem byl pozorován i u prsních nádorových linií s p53mut [52].

p53mut se příliš často nevyskytuje v kožních nádorech (cca v 17 %) a pravděpodobně nehraje výraznější roli při rozvoji maligního melanomu (MM). Přesto byl zjištěn synergický efekt u kombinovaného použití APR-246 a vemurafenibu. Vemurafenib je specifický

inhibitor mutace $BRAF^{V600E}$, která má za následek zvýšení aktivity *BRAF* kinázy vedoucí k nekontrolovanému buněčnému růstu [53]. K mutaci *BRAF* dochází přibližně u 50 % kožních melanomů, z nichž právě mutace V600E je nejčastější [54]. Pokud není gen *BRAF* mutovaný, není ani vemurafenib účinný. APR-246 v kombinaci s vemurafenibem potlačuje přirozenou i získanou rezistenci k tomuto léčivu. APR-246 zvyšuje citlivost nádorových buněk k vemurafenibu bez ohledu na přítomnost mutace v p53, což bylo potvrzeno u buněk MM nesoucích $BRAF^{V600E}$, v 3D kultuře, ale i na xenogenním modelu *in vivo* [26,55]. Dalším kompetitivním inhibitorem mutace *BRAF*, který selektivně inhibuje kinázu $BRAF^{V600E}$, je dabrafenib. V současné době probíhá klinická studie NCT03391050 fáze Ib/II, jejímž cílem je posoudit bezpečnost a léčebné účinky APR-246 v kombinaci s dabrafenibem u pacientů s neresekovatelným a/nebo metastazujícím melanomem s pozitivní mutací *BRAF*.

Kombinovaný účinek byl testován u APR-246 a bortezomibu. Jedná se o inhibitor proteazomu, ve kterém dochází k odbourávání nepotřebných proteinů. Inhibicí proteazomu dochází k omezení proteolýzy proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Kombinovaný účinek obou látek byl prokázán u mnohočetného myelomu bez závislosti na přítomnosti mutace v p53 [24].

V první ukončené klinické studii (NCT00900614) byla APR-246 podávána v monoterapii s eskalací dávky pacientům s hematologickými malignitami ($n = 15$) a pacientům s karcinomem prostaty ($n = 7$), tedy typem solidního nádoru s vysokým zastoupením p53mut. Studie prokázala klinicky dobrou toleranci k léku a příznivý farmakokinetický profil. Maximální tolerovaná dávka byla stanovena na 60 mg/kg. Vedlejší negativní účinek toxicity limitující dávku představovala zvýšená aktivita jaterních transamináz ALT/AST, která u jednoho pacienta dosahovala stupně 3–4. Nejčastějšími limitujícími toxickými účinky pak byly poruchy centrální nervové soustavy jako únava, dezorientace, závrať a bolest hlavy dosahující stupně 1 nebo 2. K projevům docházelo již v průběhu či krátce po infuzi, ale poru-

chy se jeví jako reverzibilní. Farmakokinetika látky vykazovala rozdíly mezi jednotlivými pacienty a nebyla závislá na dávce ani čase, biologický poločas rozpadu ($t_{1/2}$) byl stanoven na 4–5 hod [56].

Poslední probíhající klinická studie NCT03072043 fáze Ib/II je zaměřena na léčebné účinky APR-246 v kombinaci s azacitidinem. Cílem je zjistit, zda tato kombinovaná terapie zlepšuje celkové přežití pacientů s hematologickými maligními onemocněními, jako jsou akutní a chronická myeloidní leukemie, myelodysplastický syndrom a myeloproliferativní choroby.

APR-246 byla také testovaná v kombinaci s radioterapií. Bylo zjištěno, že záření senzitivizuje nádorové buněčné linie prostaty nesoucí p53mut a linie s deletovaným p53. Žádný účinek neměla APR-246 v kombinaci se zářením na nádorové linie nesoucí p53wt a na lidských fibroblastech [28].

Závěr

Prima-1 a APR-246 jsou látky vykazující protinádorový účinek u řady nádorových onemocnění. Hlavním mechanismem účinku v buňce je indukce apoptózy. Obě látky zvyšují expresi genů zapojených do kontroly buněčného cyklu a apoptózy v nádorových buňkách nesoucích p53mut i p53wt. V posledních letech se ukazuje, že mohou účinně indukovat procesy, které jsou na aktivitě p53 nezávislé, čímž se rozšiřují možnosti jejich klinického využití. Cytotoxická aktivita látek byla testovaná *in vitro* u řady nádorových linií a na xenogenních modelech *in vivo*, a to v monoterapii nebo v kombinaci s běžně používanými cytostatiky. V kombinaci s jinými léčivy byl velmi často zjištěn synergický účinek. Látky navíc zvyšují citlivost nádorových buněk k danému cytostatiku, dokonce napomáhají překlenout rezistenci k použitému léčivu, jejíž vznik velmi často přispívá k selhání protinádorové léčby. V kombinaci s chemoterapií či ionizujícím zářením by obě tyto látky v budoucnosti mohly nabídnout nové možnosti pro léčbu agresivnějších typů nádoru.

Literatura

1. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer

types. *Nature* 2013; 502(7471): 333–339. doi: 10.1038/nature12634.

2. Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer* 2017; 83: 258–265. doi: 10.1016/j.ejca.2017.06.023.

3. Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(5): 359–370. doi: 10.1038/nrc3711.

4. Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* 2007; 26(15): 2243–2254. doi: 10.1038/sj.onc.1210295.

5. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381): 15–16. doi: 10.1038/358015a0.

6. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(10): 701–713. doi: 10.1038/nrc2693.

7. Bykov VJ, Issaeva N, Zache N et al. Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *J Biol Chem* 2005; 280(34): 30384–30391. doi: 10.1074/jbc.M501664200.

8. Luu Y, Bush J, Cheung KJ Jr et al. The p53 stabilizing compound CP-31398 induces apoptosis by activating the intrinsic Bax/mitochondrial/caspase-9 pathway. *Exp Cell Res* 2002; 276(2): 214–222. doi: 10.1006/excr.2002.5526.

9. Boeckler FM, Joerger AC, Jaggi G et al. Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an *in silico* screened drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(30): 10360–10365. doi: 10.1073/pnas.0805326105.

10. Bykov VJ, Issaeva N, Selivanova G et al. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* 2002; 23(12): 2011–2018.

11. Bykov VJ, Zache N, Stridh H et al. PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* 2005; 24(21): 3484–3491. doi: 10.1038/sj.onc.1208419.

12. Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 2002; 8(3): 282–288. doi: 10.1038/nm0302-282.

13. Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 2009; 15(5): 376–388. doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.003.

14. Wassman CD, Baronio R, Demir Ö et al. Computational identification of a transiently open L1/S3 pocket for reactivation of mutant p53. *Nat Commun* 2013; 4: 1407. doi: 10.1038/ncomms2361.

15. Kaar JL, Basse N, Joerger AC et al. Stabilization of mutant p53 via alkylation of cysteines and effects on DNA binding. *Protein Sci* 2010; 19(12): 2267–2278. doi: 10.1002/pro.507.

16. Zhang Q, Bykov VJ, Wiman KG et al. APR-246 reactivates mutant p53 by targeting cysteines 124 and 277. *Cell Death Dis* 2018; 9(5): 439. doi: 10.1038/s41419-018-0463-7.

17. Rehman A, Chahal MS, Tang X et al. Proteomic identification of heat shock protein 90 as a candidate target for p53 mutation reactivation by PRIMA-1 in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005; 7(5): R765–R774. doi: 10.1186/bcr1290.

18. Aryee DN, Niedan S, Ban J et al. Variability in functional p53 reactivation by PRIMA-1(Met)/APR-246 in Ewing sarcoma. *Br J Cancer* 2013; 109(10): 2696–2704. doi: 10.1038/bjc.2013.635.

19. Lambert JM, Moshfegh A, Hainaut P et al. Mutant p53 reactivation by PRIMA-1MET induces multiple signaling pathways converging on apoptosis. *Oncogene* 2010; 29(9): 1329–1338. doi: 10.1038/nc.2009.425.

20. Zandi R, Selivanova G, Christensen CL et al. PRIMA-1Met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53. *Clin*

Cancer Res 2011; 17(9): 2830–2841. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3168.

21. Bykov VJ, Erikssohn SE, Bianchi J et al. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2018; 18(2): 89–102. doi: 10.1038/nrc.2017.109.

22. Liu DS, Read M, Cullinane C et al. APR-246 potently inhibits tumour growth and overcomes chemoresistance in preclinical models of oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 2015; 64(10): 1506–1516. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309770.

23. Peng X, Zhang MQ, Conserva F et al. APR-246/PRIMA-1MET inhibits thioredoxin reductase 1 and converts the enzyme to a dedicated NADPH oxidase. *Cell Death Dis* 2013; 4: e881. doi: 10.1038/cddis.2013.417.

24. Teoh PJ, Bi C, Sintosebastian C et al. PRIMA-1 targets the vulnerability of multiple myeloma of deregulated protein homeostasis through the perturbation of ER stress via p73 demethylation. *Oncotarget* 2016; 7(38): 61806–61819. doi: 10.18632/oncotarget.11241.

25. Shen J, Vakifahmetoglu H, Stridh H et al. PRIMA-1MET induces mitochondrial apoptosis through activation of caspase-2. *Oncogene* 2008; 27(51): 6571–6580. doi: 10.1038/nc.2008.249.

26. Bao W, Chen M, Zhao X et al. PRIMA-1Met/APR-246 induces wild-type p53-dependent suppression of malignant melanoma tumor growth in 3D culture and *in vivo*. *Cell Cycle* 2011; 10(2): 301–307. doi: 10.4161/cc.10.2.14538.

27. Magrini R, Russo D, Ottaggio L et al. PRIMA-1 synergizes with adriamycin to induce cell death in non-small cell lung cancer cells. *J Cell Biochem* 2008; 104(6): 2363–2373. doi: 10.1002/jcb.21794.

28. Supiot S, Zhao H, Wiman K et al. PRIMA-1(met) radiosensitizes prostate cancer cells independent of their MTP53-status. *Radiother Oncol* 2008; 86(3): 407–411. doi: 10.1016/j.radonc.2008.01.001.

29. Grellety T, Laroche-Clary A, Chaire V et al. PRIMA-1(MET) induces death in soft-tissue sarcomas cell independent of p53. *BMC Cancer* 2015; 15: 684. doi: 10.1186/s12885-015-1667-1.

30. Li Y, Mao Y, Brandt-Rauf PW et al. Selective induction of apoptosis in mutant p53 premalignant and malignant cancer cells by PRIMA-1 through the c-Jun-NH2-kinase pathway. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(6): 901–909. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-04-0206.

31. Wang T, Lee K, Rehman A et al. PRIMA-1 induces apoptosis by inhibiting JNK signaling but promoting the activation of Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352(1): 203–212. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.006.

32. Yin ZX, Hang W, Liu G et al. PARP-1 inhibitors sensitize HNSCC cells to APR-246 by inactivation of thioredoxin reductase 1 (TrxR1) and promotion of ROS accumulation. *Oncotarget* 2018; 9(2): 1885–1897. doi: 10.18632/oncotarget.21277.

33. Tessoulin B, Descamps G, Moreau P et al. PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood* 2014; 124(10): 1626–1636. doi: 10.1182/blood-2014-01-548800.

34. Russo D, Ottaggio L, Foggetti G et al. PRIMA-1 induces autophagy in cancer cells carrying mutant or wild type p53. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(8): 1904–1913. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.020.

35. Lee K, Wang T, Paszczynski AJ et al. Expression proteomics to p53 mutation reactivation with PRIMA-1 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349(3): 1117–1124. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.08.152.

36. Wang XZ, Lawson B, Brewer JW et al. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* 1996; 16(8): 4273–4280.

37. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise

- cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 2006; 13(6): 962–972. doi: 10.1038/sj.cdd.4401914.
38. Orzol P, Holcakova J, Nekulova M et al. The diverse oncogenic and tumour suppressor roles of p63 and p73 in cancer: a review by cancer site. *Histol Histopathol* 2015; 30(5): 503–521. doi: 10.14670/HH-30.503.
39. Shen J, van den Bogaard EH, Kouwenhoven EN et al. APR-246/PRIMA-1(MET) rescues epidermal differentiation in skin keratinocytes derived from EEC syndrome patients with p63 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(6): 2157–2162. doi: 10.1073/pnas.1201993110.
40. Shalom-Feuerstein R, Serror L, Aberdam E et al. Impaired epithelial differentiation of induced pluripotent stem cells from ectodermal dysplasia-related patients is rescued by the small compound APR-246/PRIMA-1MET. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(6): 2152–2156. doi: 10.1073/pnas.1201753109.
41. Rökaeus N, Shen J, Eckhardt I et al. PRIMA-1(MET)/APR-246 targets mutant forms of p53 family members p63 and p73. *Oncogene* 2010; 29(49): 6442–6451. doi: 10.1038/onc.2010.382.
42. Saha MN, Jiang H, Yang Y et al. PRIMA-1Met/APR-246 displays high antitumor activity in multiple myeloma by induction of p73 and Noxa. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(11): 2331–2341. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1166.
43. Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 2009; 15(5): 376–388. doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.003.
44. Perdrix A, Najem A, Saussez S et al. PRIMA-1 and PRIMA-1(Met) (APR-246): from mutant/wild type p53 reactivation to unexpected mechanisms underlying their potent anti-tumor effect in combinatorial therapies. *Cancers (Basel)* 2017; 9(12): pii: E172. doi: 10.3390/cancers9120172.
45. Nahi H, Lehmann S, Mollgard L et al. Effects of PRIMA-1 on chronic lymphocytic leukaemia cells with and without hemizygous p53 deletion. *Br J Haematol* 2004; 127(3): 285–291. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05210.x.
46. Roh JL, Kang SK, Minn I et al. p53-Reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; 47(1): 8–15. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.10.011.
47. Mohell N, Alfredsson J, Fransson A et al. APR-246 overcomes resistance to cisplatin and doxorubicin in ovarian cancer cells. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1794. doi: 10.1038/cddis.2015.143.
48. Fransson A, Glaessgen D, Alfredsson J et al. Strong synergy with APR-246 and DNA-damaging drugs in primary cancer cells from patients with TP53 mutant high-grade serous ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2016; 9(1): 27. doi: 10.1186/s13048-016-0239-6.
49. Izetti P, Hautefeuille A, Abujamra AL et al. PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines. *Invest New Drugs* 2014; 32(5): 783–794. doi: 10.1007/s10637-014-0090-9.
50. Messina RL, Sanfilippo M, Vella V et al. Reactivation of p53 mutants by prima-1 [corrected] in thyroid cancer cells. *Int J Cancer* 2012; 130(10): 2259–2270. doi: 10.1002/ijc.26228.
51. Deben C, Lardon F, Wouters A et al. APR-246 (PRIMA-1 (MET)) strongly synergizes with AZD2281 (olaparib) induced PARP inhibition to induce apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Lett* 2016; 375(2): 313–322. doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.017.
52. Synnott NC, Murray A, McGowan PM et al. Mutant p53: a novel target for the treatment of patients with triple-negative breast cancer? *Int J Cancer* 2017; 140(1): 234–246. doi: 10.1002/ijc.30425.
53. Arenbergerova M, Puzanov I. BRAF mutation: a novel approach in targeted melanoma therapy. *Klin Onkol* 2012; 25(5): 323–328.
54. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892): 949–954. doi: 10.1038/nature00766.
55. Krayem M, Journe F, Wiedig M et al. p53 Reactivation by PRIMA-1(Met) (APR-246) sensitises (V600E/K)BRAF melanoma to vemurafenib. *Eur J Cancer* 2016; 55: 98–110. doi: 10.1016/j.ejca.2015.12.002.
56. Lehmann S, Bykov VJ, Ali D et al. Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(29): 3633–3639. doi: 10.1200/JCO.2011.40.7783.

Acetylsalicylová kyselina a její potenciál v chemoprevenci kolorektálního karcinomu

Acetylsalicylic Acid and its Potential for Chemoprevention of Colorectal Carcinoma

Podhorec J.^{1,2}, Hrstka R.¹, Bílek O.², Tuček Š.², Navrátil J.², Michalová E.¹, Vojtěšek B.¹

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Nesteroidní protizánětlivé léky (non-steroidal anti-inflammatory drugs – NSAID) představují skupinu léků inhibujících enzym cyklooxygenázu (COX) a vykazujících účinek analgetický, anti-pyretický a antiinflatorní. Díky své efektivitě, dobré toleranci a snadné dostupnosti patří k celosvětově nejvíce užívaným lékům. Již několik desítek let přibývají důkazy o jejich protinádorovém účinku, přičemž největší množství publikovaných prací se týká kolorektálního karcinomu (colorectal cancer – CRC). Na základě výsledků pokusů *in vitro* a *in vivo* a dat získaných z epidemiologických a klinických studií se v současné době diskutuje o možnosti nasazení NSAID zejména v rámci tzv. chemoprevence CRC, jejímž cílem je zabránit vzniku nebo rekurenci prekanceróz a nádorů. Nadějným lékem v této indikaci je acetylsalicylová kyselina (acetylsalicylic acid – ASA), která je nejstarším, více než 100 let používaným členem rodiny NSAID. Předpokládá se, že neselektivní ireverzibilní inhibice COX je důležitým, nikoli však jediným mechanismem jejího protinádorového účinku. Širšímu využití v chemoprevenci CRC brání nedostatečně definovaná cílová skupina pacientů a zejména pak obavy z gastrointestinální a renální toxicity vyvolané zvláště při jejím dlouhodobém užívání. **Cíl:** Předkládaná přehledová práce seznamuje s úlohou COX v nádorové biologii CRC a poukazuje na výsledky nejzajímavějších experimentů objasňujících protinádorový efekt ASA. V neposlední řadě rozebírá nejdůležitější publikované klinické analýzy chemopreventivního účinku ASA u CRC a hodnotí aktuální situaci.

Klíčová slova

antiflogistika nesteroidní – kyselina acetylsalicylová – kolorektální karcinom – cyklooxygenáza – chemoprevence

Summary

Background: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) represent a group of medications inhibiting cyclooxygenase (COX) enzyme, and, in parallel, these drugs show also analgesic, anti-pyretic and anti-inflammatory effects. Due to their efficiency, good tolerance and easy availability, they belong to the world's most used drugs. For decades, evidence of their anti-tumor activity has been growing, with the largest amount of published work being related to colorectal cancer (CRC). Based on both *in vitro* and *in vivo* experiments and data obtained from epidemiological and clinical studies, potential application of NSAID as chemo-preventive treatment for CRC patients is recently discussed in order to prevent development or recurrence of precanceroses and tumors. Promising treatment for such indication would be acetylsalicylic acid (ASA), which is the oldest, more than 100 years used member of the NSAID family. Nonselective irreversible COX inhibition is an important but probably not solely mechanism of its anticancer activity. Notably, wider use of ASA in chemoprevention is also prevented due to particular concerns about gastrointestinal and renal toxicity caused especially by its long-term use. **Aims:** This review introduces the role of COX in tumor biology of CRC and highlights the results of the most interesting experiments illustrating the anti-tumor effect of ASA. Moreover, our work evaluates the most important published clinical analyzes of the ASA chemopreventive effect on CRC and discusses the current state.

Key words

non-steroidal anti-inflammatory agents – acetylsalicylic acid – colorectal carcinoma – cyclooxygenase – chemoprevention

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805) a GAČR 16-14829S.

This work was supported by the projects MEYS – NPS I – LO1413, MH CZ – DRO (MMCI, 00209805) and by Czech Science Foundation project no. 16-14829S.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslání do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Ján Podhorec

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie
Klinika komplexní onkologické péče
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: jan.podhorec@mou.cz

Přijato/Accepted: 10. 9. 2017

doi: 10.14735/amko20182577

Úvod

Kolorektální karcinom (colorectal cancer – CRC) patří celosvětově mezi nejčastější nádorová onemocnění, v roce 2012 s počtem 1,4 milionu nově diagnostikovaných případů obsadil třetí příčku. Incidence vykazuje narůstající trend a existují odhady, že do roku 2030 dosáhne hodnoty kolem 2,2 milionu [1]. Dle odhadů lze v roce 2018 předpokládat v Evropě kolem 500 000 případů CRC a přibližně 243 000 úmrtí [2]. Vznik CRC je dlouhodobý proces zahrnující progresi prvotních lézí do stadia adenomu a následně CRC [3]. Jedná se o složitý mnohastupňový proces, ve kterém hraje klíčovou roli více environmentálních a genetických faktorů, např. mutace v klíčových genech *APC* a *TP53*. Ukazuje se, že existuje propojení mezi kancerogenezi CRC a střevním zánětem, obzvláště chronickým [4]. Jedním ze společných jmenovatelů těchto procesů je enzym cyklooxygenáza (COX), která se účastní metabolismu kyseliny arachidonové, jehož výslednými produkty jsou prostaglandiny (PG), zejména pak PGE₂, a tromboxan A₂. V posledních třech desetiletích se postupně rozvíjí snaha o ovlivnění s nádorem asociovaného zánětu prostřednictvím léků ze skupiny nesteroidních antiflogistik (non-steroidal anti-inflammatory drugs – NSAID) v rámci koncepce tzv. chemoprevence. Byly publikovány výsledky mnoha epidemiologických a experimentálních studií, které potvrzují efekt NSAID v prevenci vzniku adenomů i CRC. Z několika zvažovaných léků se jeví jako nejvíce perspektivní použití acetylsalicylové kyseliny (acetylsalicylic acid – ASA, v anglosaské literatuře uváděna častěji jako aspirin). Jedná se o nejstaršího zástupce NSAID, který neselektivně inhibuje COX, což je pravděpodobně základní, i když ne jediný mechanismus jeho protinádorového účinku.

Cyklooxygenáza a prostaglandiny v kancerogenezi CRC

V literatuře se obvykle diskutují dvě izoformy COX odlišující se kromě jiného stupněm exprese v různých tkáních. Zatímco COX-1 je konstitutivně exprimována jako tzv. housekeeping enzym v naprosté většině tkání, indukibilní izo-

forma COX-2 se nachází v tkáních postižených zánětem, v prekancerózních lézích [5] a v tkáních maligních [6]. Někdy se jako další izoforma uvádí také COX-3, která je variantou genetického sestřihu COX-1. Funkcí COX je katalyzovat konverzi arachidonové kyseliny na tromboxan A₂ a prostaglandin H₂ (PGH₂), který je prekurzorem pro syntézu dalších prostanooidů. Je doloženo, že COX-2 preferenčně syntetizuje prostacyklin a prostaglandin E₂ (PGE₂) [7]. Z hlediska zánětu a kancerogeneze je ze všech prostaglandinů pravděpodobně nejdůležitějším právě PGE₂, jehož zvýšená hladina je detekovatelná u zvířecích modelů CRC a v klinických vzorcích získaných z adenomatózních polypů a nádorů [8]. Navázáním PGE₂ na povrchový buněčný receptor EP1-EP4 dojde zejména ke spuštění signalizace cestou G-proteinu, přičemž diverzita exprese jednotlivých receptorů je jedním z důvodů rozmanitosti biologických účinků PGE₂, a to nejenom v kancerogenezi [9]. Signální cesta COX-2/PGE₂ se u CRC podílí především na indukci antiapoptotického proteinu Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) [10]. Jejím působením dále dochází k transaktivaci receptoru epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor – EGFR) a spuštění mitogenního signálu cestou ERK2 (mitogen-activated protein kinase 1 – MAPK1) [11]. Aktivací dráhy PI3K-PKB (phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B) dochází k rozpojení komplexu axin-GSK3-beta (glycogen synthase kinase 3- beta) a aktivací beta-kateninu, což vede ke stimulaci růstu nádorových buněk [12]. COX-2/PGE₂ dále aktivuje dráhu PI3K/PKB, čímž zvyšuje invazivní potenciál buněk CRC [13]. Svou roli hraje i v oblasti nádorové angiogeneze, neboť prostřednictvím transkripčního faktoru indukovaného hypoxií (hypoxia-inducible factor 1 – HIF-1) indukuje expresi vaskulárního endotelálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor – VEGF) [14]. V neposlední řadě se COX podílí i na úniku nádorových buněk před imunitním dohledem – popsaná je suprese dendritických buněk, NK (natural killer) buněk nebo T lymfocytů [15]. Z klinicko-patologického hlediska je zajímavá souvislost zvýšené exprese COX-2 s parametry, jako je velikost

tumoru, nízká a střední diferenciace nádorových buněk, dále souvislost s vyšším počtem uzlinových metastáz, neovaskularizací tumoru, ale také s horším přežíváním [16]. Zvýšená exprese COX-2 byla asociována se zvýšenou pravděpodobností rekurence tumoru a obzvláště se vznikem hematogenně se šířících metastáz [17].

Nesteroidní antiflogistika (NSAID)

NSAID jsou skupinou léků, resp. látek, které našly široké využití zejména pro svůj analgetický, antipyretický a antiflogistický efekt. Základním mechanismem jejich účinku je inhibice COX, která vede ke snížení produkce prostaglandinů [18]. Jednotliví zástupci skupiny NSAID se liší svojí selektivitou ke COX-1, resp. COX-2. Např. acetylsalicylová kyselina (acetylsalicylic acid – ASA) v nižších koncentracích inhibuje selektivně COX-1, ve vyšších pak také COX-2. K neselektivním inhibitorům COX se řadí např. ketoprofen, diklofenak, indometacin a ibuprofen. Existují také tzv. COX-2 preferenční NSAID (nimesulid, meloxicam) a dále pak COX-2 selektivní NSAID (celecoxib, rofekoxib). Inhibice COX je rovněž důvodem jejich renální a gastrointestinální toxicity způsobené dlouhodobým podáváním těchto látek. Ta klesá se zvyšující se mírou selektivity ke COX-2, zároveň se ale při dlouhodobém podávání selektivních inhibitorů COX-2 objevuje toxicita kardiovaskulární [19]. Nežádoucí účinky jsou pro dlouhodobé použití nebo vyšší dávkování limitující a mohou být nezřídka i fatální. Výsledky laboratorních experimentů spolu s epidemiologickými a klinickými studiemi přinášejí poměrně jednoznačné důkazy o antineoplastickém efektu NSAID, který je nejvýraznější a také nejlépe prozkoumaný u CRC. Jedním z prvních klinických průkazů možného efektu NSAID u kolorektálních prekanceróz bylo použití sulindaku u pacientů s Gardnerovým syndromem, které vedlo k radikálnímu snížení počtu polypů [20]. I když je inhibice COX podstatou většiny farmakologických efektů NSAID, již poměrně dlouho je známo, že existují i jiné, na inhibici COX a syntéze prostaglandinů nezávislé mechanismy působení. Například podání celeko-

xibu jako vysoce selektivního inhibitoru COX-2 v závislosti na dávce indukovalo zástavu buněčného cyklu v G0/G1 fázi v buněčných liniích odvozených od CRC, a to dokonce i v případě, že buňky neexprimovaly COX-2 [21]. Celekoxib se navíc ukázal být nejen selektivním inhibitor COX-2, ale navíc i poměrně silným inhibitor PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1), která je klíčovou kinázou u mnoha proonkogenních signálních drah [22].

Acetylsalicylová kyselina, molekulární mechanismy jejího protinádorového účinku, klinický význam

ASA se řadí k nescifickým inhibitorům COX, přičemž inhibice je dosažena reverzibilní acylací klíčových serinových zbytků na molekule COX. Konkrétní antineoplastické mechanismy ASA jsou různorodé a nadále zůstávají předmětem intenzivního výzkumu. Lze odůvodněně předpokládat, že minimálně zčásti jsou tyto mechanismy podmíněny snížením koncentrace PGE₂, což úzce souvisí se všemi výše uvedenými důsledky. V buněčných liniích odvozených od CRC způsobuje ASA zejména u buněk s mutací v *PIK3CA* zástavu buněčného cyklu a indukci apoptózy [23]. Dále je popsáno zvýšení hladiny „mismatch repair“ proteinů [24]. Dochází k uvolnění cytochromu c a k aktivaci kaspáz 9, 3 a 8, snižuje se hladina cytoplasmatického IκBα, čímž dochází k indukci signalizace cestou NFκB, což je nejspíše nejdůležitější způsob, kterým ASA způsobuje apoptózu [25]. ASA dále oslabuje aktivitu T buněčného faktoru (T-cell factor – TCF), aniž by narušila komplex beta-katenin/TCF, což vede ke snížení transkripce cílových genů signalizační dráhy, která hraje klíčovou roli v regulaci buněčné proliferace během embryonálního vývoje [26]. ASA je jako nejstarší člen rodiny NSAID v klinické praxi využívaná již více než 100 let, díky čemuž je profil její toxicity i při dlouhodobém užívání dobře znám. Zhruba od 80. let minulého století se uvažuje o jejím využití v rámci chemoprevence nádorových onemocnění. Je slibným kandidátem při prevenci kolorektálních adenomů i adenokarcinomů, a to jak sporadických, tak

i hereditárně podmíněných. Randomizovaná, dvojitě zaslepená studie publikovaná v roce 2003 zkoumající efekt ASA na tvorbu polypů srovnávající placebo vzhledem k ASA v dávkách 81 mg/den a 325 mg/den prokázala mírné snížení rizika ve skupině pacientů užívajících 81 mg ASA denně (RR 0,81; 95% CI 0,69–0,96) [27]. Užívání ASA (v dávce 160/300 mg/den) vedlo ke snížení počtu polypů pouze po roce od zahájení studie (RR 0,73; 95% CI 0,52–1,04), ne však po 4 letech užívání [28]. Metaanalýza čtyř randomizovaných studií (Thrombosis Prevention Trial; British Doctors Aspirin Trial; Swedish Aspirin Low Dose Trial; UK-TIA Aspirin Trial) a studie Dutch TIA Aspirin Trial, publikovaná v roce 2010 a hodnotící efekt ASA na incidenci CRC a úmrtí v jeho důsledku ve vztahu k délce podávání, dávce a umístění tumoru ukázala, že z celkového počtu 14 033 sledovaných pacientů mělo 2,8 % (391) pacientů diagnostikovaný CRC (medián follow-up 18,3 roku). Užívání ASA snížilo 20leté riziko vzniku CRC (HR 0,76; 0,60–0,96, $p = 0,02$), vč. mortality (HR 0,65; 0,48–0,88, $p = 0,005$), zlepšení parametrů však nebylo zjištěno u karcinomů rekta. Taktéž nebyl prokázán vyšší benefit v případě podávaných dávek ASA vyšších než 75 mg/den [29]. Nicméně v současnosti existuje doporučení americké organizace U. S. Preventive Services Task Force (USPSTF) (se stupněm „B“) k užívání nízké dávky (tj. < 100 mg denně) ASA jako primární prevence kardiovaskulárních nemocí a CRC u pacientů ve věkovém rozmezí 50–59 let s min. 10% 10letým kardiovaskulárním rizikem spolu s min. očekávanou délkou života 10 let, kteří nejsou rizikovou stranou krvácení. U pacientů ve věku 60–69 let je zdůrazněna nutnost individuálního rozhodování [30]. Mezinárodní multicentrická, randomizovaná a placebem kontrolovaná klinická studie zkoumala účinek ASA (600 mg/den) a/nebo tzv. rezistentního škrobu u mladých pacientů s familiární adenomatózní polypózou [31]. Primárním sledovaným cílem bylo množství polypů v rektu a v kolon sigmoideum. Výsledek této studie nesplnil očekávání, neboť v žádném ze zkoumaných ramen nebylo snížení počtu polypů pozorováno.

Byl pozorován pouze trend ve snížení tzv. polypové nálože, a to ve skupině pacientů užívajících ASA. Povzbudivých výsledků však bylo dosaženo ve studii CAPP2 zkoumající efekt ASA u pacientů s Lynchovým syndromem (hereditární nepolypózní CRC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer – HNPCC)) [32]. Z 861 pacientů bylo do skupiny užívajících ASA zařazeno 427, do skupiny užívajících placebo pak 434. Průměrná doba užívání ASA činila 25 měsíců, průměrný follow-up byl 55,7 měsíce a za tuto dobu vzniklo u 48 pacientů 53 primárních nádorů kolorekta – 18 ve skupině s ASA, 30 ve skupině s placebem. Analýza času do vzniku prvního nádoru prokázala HR 0,63 (95% CI 0,35–1,13). Pacienti, kteří dokončili 2 roky intervence, vykazovali HR 0,41 (0,19–0,86, $p = 0,02$). Během intervence byly nežádoucí účinky ASA srovnatelné s placebem. Význam užívání ASA v nízkých dávkách zpochybnila nedávno publikovaná analýza kohorty 8 391 pacientů s CRC stadia Dukes A–C (data získaná ze Scottish Cancer Registry) [33]. Podávání ASA v nízkých dávkách nebylo asociováno se snížením úmrtnosti z důvodu CRC (adjustované HR 1,17; 95% CI 1,00–1,36), podobně bez efektu bylo i užívání před diagnózou (adjustované HR 0,86; 95% CI 0,88–1,05). V současné době probíhá několik randomizovaných studií, většinou fáze III, jejichž výsledky lze očekávat v nejbližších letech a které by mohly zodpovědět alespoň některé otázky týkající se užití ASA v prevenci a terapii kolorektálních adenomů a CRC (tab. 1) [34].

Závěr

Lze konstatovat, že úloha COX-2 a PGE₂ v kancerogenezi CRC je nezpochybnitelná. Avšak navzdory počátečním tendencím nelze jednoznačně připisovat protinádorový účinek NSAID a konkrétně ASA inhibicí COX a následnému snížení hladiny PGE₂. Mechanismus působení je nejspíše komplexní a přestože přibývá důkazů o protinádorové aktivitě těchto léků nezávislé na COX, nadále zůstává mnoho otázek nezodpovězeno. Lepší pochopení těchto mechanismů by tak mohlo vést i ke stanovení prediktivních faktorů nasazení

Tab. 1. Vybrané klinické studie zkoumající ASA u kolorektálního karcinomu, dostupné z clinicaltrials.gov ke dni 7. 9. 2018 [34].

Oficiální název studie, (clinicaltrials.gov identifikátor)	Fáze, nábor, zkoušená medikace, předpokládané ukončení
A Phase III Double-blind Placebo-controlled Randomised Trial of Aspirin on Recurrence and Survival in Colon Cancer Patients (NCT03464305)	fáze III, nábor probíhá, ASA vs. placebo, 12/2026
Adjuvant Aspirin Treatment in PIK3CA Mutated Colon Cancer Patients. A Randomized, Double-blinded, Placebo-controlled, Phase III Trial (NCT02467582)	fáze III, nábor probíhá, ASA vs. placebo, 6/2029
Assessment of the Effect of a Daily Chemoprevention by Low-dose Aspirin of New or Recurrent Colorectal Adenomas in Patients With Lynch Syndrome (NCT02813824)	fáze III, nábor probíhá, ASA vs. placebo, 12/2025
Enteric-coated Aspirin for Prevention of Postsurgical Recurrence and Metastasis in Asian Colorectal Cancer Patients (the APREMEC Trial): a Large-scale Multicenter Randomized Double-blind Placebo-controlled Trial (NCT02607072)	fáze III, nábor probíhá, ASA vs. placebo, 10/2022
A Randomized Double-blind Placebo-controlled Study With ASA Treatment in Colorectal Cancer Patients With Mutations in the PI3K Signaling Pathway (NCT02647099)	fáze III, nábor probíhá, ASA vs. placebo, 3/2022
Aspirin for Dukes C and High Risk Dukes B Colorectal Cancers – An International, Multi-Center, Double Blind, Randomized Placebo Controlled Phase III Trial (NCT00565708)	fáze III, nábor probíhá, ASA vs. placebo, 6/2026
A Randomized, Phase II, Double-blind, Placebo-controlled, Multicenter, 2 x 2 Factorial Design Biomarker Tertiary Prevention Trial of Low-dose Aspirin and Metformin in Stage I–III Colorectal Cancer Patients. The ASAMET Trial (NCT03047837)	fáze II, nábor probíhá, ASA a/nebo metformin, 3/2020
PD-1 Antibody Combined With COX Inhibitor in MSI-H/dMMR or High TMB Colorectal Cancer: a Single Arm Phase II Study (NCT03638297)	fáze II, nábor probíhá, PD-1 protilátka a ASA/celecoxib, 12/2019
A Randomised Double Blind Dose Non-inferiority Trial of a Daily Dose of 600 mg Versus 300 mg Versus 100 mg of Enteric Coated Aspirin as a Cancer Preventive in Carriers of a Germline Pathological Mismatch Repair Gene Defect, Lynch Syndrome (NCT02497820)	fáze III, nábor zatím neprobíhá, ASA, různé dávkování, 9/2027
French Prospective Randomised Double Blind Study, on Aspirin Versus Placebo in Resected Colon Cancer With PI3K Mutation (NCT02945033)	fáze III, nábor zatím neprobíhá, ASA vs. placebo, 7/2024

ASA – acetylsalicylová kyselina

ASA v chemoprevenci. Především pak riziko gastrointestinální a renální toxicity, zvláště pak při dlouhodobém užívání, které je pro chemoprevenci nezbytné, je jedním z hlavních důvodů, které zatím brání plošnému zavedení ASA v této indikaci. Bude nejspíše nutná selekce vhodných skupin pacientů, u kterých bude benefit převažovat nad rizikem. Ukazuje se např., že chemoprevence ASA má své odůvodnění u pacientů, jejichž nádory vykazují nadměrnou expresi COX-2 [35]. Jedním z prediktorů léčebné odpovědi může být např. mutační stav *PIK3CA*, jak prokázala molekulárně-patologická epidemiologická studie publikovaná v roce 2012, která poukázala na výrazně nižší riziko smrti z důvodu CRC v případě mutovaného *PIK3CA* (HR 0,18; 95% CI 0,06–0,61) [36]. Nezodpovězenou rovněž zůstává otázka opti-

mální dávky, délky užívání a také vhodné doby zahájení chemoprevence.

Literatura

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017; 66(4): 683–691. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49(6): 1374–1403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
3. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 695–723. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.092805.
4. Long AG, Lundsmith ET, Hamilton KE. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2017; 13(4): 341–351. doi: 10.1007/s11888-017-0373-6.
5. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107(4): 1183–1188.
6. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000; 89(12): 2637–2645.

7. Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem* 1999; 274(17): 11660–11666.
8. Pugh S, Thomas GA. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 1994; 35(5): 675–678.
9. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 2007; 282(16): 11613–11617. doi: 10.1074/jbc.R600038200.
10. Sheng HM, Shao JY, Morrow JD et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E-2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58(2): 362–366.
11. Pai R, Soreghan B, Szabo IL et al. Prostaglandin E-2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002; 8(3): 289–293. doi: 10.1038/nm0302-289.
12. Castellone MD, Teramoto H, Williams BO et al. Prostaglandin E-2 promotes colon cancer cell growth through a G(s)-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* 2005; 310(5753): 1504–1510. doi: 10.1126/science.1116221.
13. Sheng H, Shao J, Washington MK et al. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276(21): 18075–18081. doi: 10.1074/jbc.M009689200.

14. Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E-2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003; 63(9): 2330–2334.
15. Liu B, Qu L, Yan S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int* 2015; 15: 106. doi: 10.1186/s12935-015-0260-7.
16. Masunaga R, Kohno H, Dhar DK et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6(10): 4064–4068.
17. Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E et al. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83(3): 324–328. doi: 10.1054/bjoc.2000.1270.
18. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12(12): 1063–1073.
19. Antman EM. Evaluating the cardiovascular safety of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Circulation* 2017; 135(21): 2062–2072. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027288.
20. Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. *J Surg Oncol* 1983; 24(1): 83–87.
21. Maier TJ, Schilling K, Schmidt R et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(8): 1469–1478. doi: 10.1016/j.bcp.2003.12.014.
22. Arico S, Pattingre S, Bauvy C et al. xxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem* 2002; 277(31): 27613–27621. doi: 10.1074/jbc.M201119200.
23. Gu M, Nishihara R, Chen Y et al. Aspirin exerts high anti-cancer activity in PIK3CA-mutant colon cancer cells. *Oncotarget* 2017; 8(50): 87379–87389. doi: 10.18632/oncotarget.20972.
24. Goel A, Chang DK, Ricciardiello L et al. A novel mechanism for aspirin-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1): 383–390.
25. Piqué M, Barragán M, Dalmau M et al. Aspirin induces apoptosis through mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett* 2000; 480(2–3): 193–196.
26. Dihlmann S, Siermann A, von Knebel Doeberitz M. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate β -catenin/TCF-4 signaling. *Oncogene* 2001; 20(5): 645–653. doi: 10.1038/sj.onc.1204123.
27. Baron JA, Cole BF, Sandler RS et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2003; 348(10): 891–899. doi: 10.1056/NEJMoa021735.
28. Benamouzig R, Uzzan B, Deyra J et al. Prevention by daily soluble aspirin of colorectal adenoma recurrence: 4-year results of the APACC randomised trial. *Gut* 2012; 61(2): 255–261. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300113.
29. Rothwell PM, Wilson M, Elwin C-E et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010; 376(9754): 1741–1750. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61543-7.
30. Bibbins-Domingo K. Aspirin use for the primary prevention of cardiovascular disease and colorectal cancer: U.S. preventive services task force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2016; 164(12): 836–845. doi: 10.7326/M16-0577.
31. Burn J, Bishop DT, Chapman PD et al. A randomized placebo-controlled prevention trial of aspirin and/or resistant starch in young people with familial adenomatous polyposis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4(5): 655–665. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0106.
32. Burn J, Gerdes A-M, Macrae F et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet* 2011; 378(9809): 2081–2087. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61049-0.
33. Gray RT, Coleman HG, Hughes C et al. Low-dose aspirin use and survival in colorectal cancer: results from a population-based cohort study. *BMC Cancer* 2018; 18(1): 228. doi: 10.1186/s12885-018-4142-y.
34. clinicaltrials.gov. [online]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>
35. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* 2007; 356(21): 2131–2142. doi: 10.1056/NEJMoa067208.
36. Liao X, Lochhead P, Nishihara R et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* 2012; 367(17): 1596–1606. doi: 10.1056/NEJMoa1207756.

Expres a funkční charakterizace miR-34c u karcinomu děložního hrdla

Expression and Functional Characterization of miR-34c in Cervical Cancer

Sommerová L.¹, Fraňková H.¹, Anton M.², Jandáková E.³, Vojtěšek B.¹, Hrstka R.¹

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno

³ Ústav patologie, LF MU a FN Brno

Souhrn

Východiska: Karcinom děložního hrdla je čtvrtým nejčastějším onkologickým onemocněním u žen a v drtivé většině případů je spojen s infekcí lidskými papilomaviry. Virové infekce jsou obvykle doprovázeny morfologickými změnami epitelálních buněk, avšak pomocí stávajících dostupných vyšetřovacích metod není lehké rozlišit, zda se jedná o projevy produktivní infekce, nebo změny vedoucí ke vzniku maligního onemocnění. Z toho důvodu stále narůstá potřeba nalézt vhodné diagnostické biomarkery karcinomu děložního hrdla, např. ve formě miRNA, tj. malých nekódujících molekul RNA regulujících genovou expresi. **Materiál a metody:** Hladina miR-34c v cervikálních nádorových liniích byla stanovena pomocí kapkové digitální polymerázové řetězové reakce. Zvýšení a inhibice exprese miR-34c *in vitro* bylo dosaženo pomocí transienční transfekce s využitím specifických oligonukleotidů, a to miRNA mimikujících, nebo miRNA inhibujících. Buněčná proliferace byla analyzována barvením krystalovou violetí s následným spektrofotometrickým měřením. Změny v migračních vlastnostech byly studovány pomocí „scratch“ testu. Expres vybraných proteinů byla stanovena imunochemicky. **Výsledky:** Inhibice exprese miR-34c byla spojena s mírným zvýšením buněčné proliferace a především s výrazným zvýšením schopnosti buněk migrovat. Analýza exprese miR-34c prováděná na souboru 39 dysplastických tkání a 35 vzorků zdravých kontrol následně ukázala signifikantní rozdíl ($p < 0,01$) v hladině této miRNA. **Závěr:** Komparativní expresní analýza prokázala signifikantně sníženou expresi miR-34c u prekanceróz děložního hrdla v porovnání s normálním netransformovaným epitelem. Při modulaci exprese miR-34c *in vitro* byla potvrzena tumor supresorová úloha miR-34c u cervikálních malignit.

Klíčová slova

karcinom děložního hrdla – HPV – miRNA – HSIL – hsa-miR-34c – prekanceróza

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413, GACR P206/12/G151 a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the projects MEYS – NPS I – LO1413, P206/12/G151 and MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. Mgr. Roman Hrstka, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: hrstka@mou.cz

Přijato/Accepted: 16. 7. 2018

doi: 10.14735/amko20182582

Summary

Background: Cervical cancer is the fourth most common cancer in women and is usually associated with human papillomavirus infection. Viral infections are usually characterized by morphological changes of epithelial cells; however, it is difficult to determine using recently available screening methods whether the changes are caused by productive infection or by malignant disease. Thus, new efforts are required to find novel diagnostic biomarkers of cervical cancer, such as miRNAs, which are small non-coding RNAs involved in the regulation of gene expression. **Materials and Methods:** miR-34c levels in cervical cancer cell lines were determined by the droplet-digital polymerase chain reaction. Changes in miR-34c expression in vitro were achieved by transient transfection with a specific miRNA mimic and inhibitor oligonucleotides. Cell proliferation was analyzed by crystal violet staining followed by spectrophotometric measurements. The effect on migratory properties was studied using a „scratch“ assay. Western blotting analysis was used to determine the expression of selected proteins. **Results:** The downregulation of miR-34c expression was associated with a slight increase in cellular proliferation and a significant increase in cell migration. The analysis of miR-34c expression performed on a set of 39 dysplastic tissues and 35 samples of healthy controls subsequently revealed a significant difference ($p < 0.01$) in the level of this miRNA. **Conclusion:** Comparative expression analysis revealed lower expression of miR-34c in cervical precanceroses than in normal untransformed epithelium. in vitro modulation of miR-34c expression revealed its tumor suppressor role in cervical malignancies.

Key words

cervical cancer – HPV – miRNA – HSIL – hsa-miR-34c – precancerosis

Úvod

Karcinogeneze děložního hrdla je více-
stupňový proces, který je započat infekcí
lidskými papilomaviry (human papillo-
mavirus – HPV) s následnou epizomální
perzistencí viru v hostitelské buňce
a jeho začleněním do genomu. Ač-
koli bylo popsáno více než 200 různých
kmenů lidských HPV [1], se vznikem pre-
kanceróz a následným nádorovým one-
mocněním jsou spojovány tzv. high-
-risk kmeny, především HPV16 a HPV18,
které jsou původcem přibližně 70 %
všech karcinomů děložního hrdla [2]. Sa-
motnému vzniku karcinomu předchází
vývoj přes prekancerózu, tzv. high-grade
dlaždicobuněčnou intraepiteliální lézi
(high-grade squamous intraepithelial
lesions – HSIL). Za iniciaci maligní trans-
formace jsou zodpovědné zejména vi-
rové onkoproteiny rané fáze E6 a E7,
které inhibují tumor supresorové pro-
teiny p53 a pRb (retinoblastomový pro-
tein). Protein p53 se aktivně podílí na
celé řadě protinádorových funkcí, vč.
regulace apoptózy, buněčného cyklu, ge-
nomové stability, angiogeneze a dalších
procesů spojených s maligní transfor-
mací. pRb především blokuje buněčný
cyklus v G1 fázi, čímž brání buňkám, aby
se nekontrolovaně množily. V případě,
že je buňka připravená k dělení, dochází
k fosforylaci pRb a tím jeho inaktivaci [3].

Vzhledem ke skutečnosti, že stávající
dostupné vyšetřovací metody nedokáží
rozlišit, zda morfologické změny v epi-
telu děložního hrdla povedou ke vzniku

nádoru či nikoli, roste akutní potřeba
nalézt diagnostické biomarkery umož-
ňující stanovit riziko vzniku karcinomu
děložního hrdla. Aktuální a značně atrak-
tivní možnost v tomto směru představují
malé nekódující RNA molekuly zvané
mikroRNA (miRNA). miRNA se obvykle
váží na 3' UTR oblast (3' untranslated re-
gion), tedy 3' nepřekládanou oblast cí-
lové mRNA, a indukují její degradaci
nebo inhibují její translaci [4–6]. Mohou
tudíž plnit funkci onkogenů, kdy inhi-
bují expresi nádorových supresorů a je-
jich hladina je v nádorové tkáni zvýšená,
nebo mohou mít naopak funkci antion-
kogenů a inhibovat expresi onkogenů,
v tomto případě se v maligní tkáni ob-
vykle setkáváme s jejich sníženou hlad-
inou. Právě díky změnám exprese v ná-
dorové tkáni mohou miRNA sloužit jako
diagnostické, prediktivní a prognostické
biomarkery, či dokonce i jako léčebné
modalitě uplatnitelné při terapii nádoro-
vých onemocnění [7].

Spektrum miRNA spojených s karcino-
mem děložního hrdla není kompletně
popsáno, stejně tak ani úloha doposud
popsaných miRNA ve vzniku a rozvoji to-
hoto onemocnění. V naší práci jsme se
zaměřili na rodinu miR-34, především
miR-34c, jejíž členové se uplatňují jako
nádorové supresory, neboť často zastá-
vají úlohu prostředníků v rámci signali-
zace mezi proteinem p53 a jeho cílovými
molekulami a podílejí se tak na regulaci
buněčné proliferace, migrace, invazivity,
angiogeneze a apoptózy [8,9].

Materiál a metody

Buněčné linie odvozené od karcinomu
děložního hrdla C-4I, HeLa (obě HPV18+),
Ca Ski a SiHa (obě HPV16+) byly kultivo-
vány v D-MEM (HeLa), RPMI (Ca Ski, SiHa)
a McCoy's (C-4I) médiu s přidavkem 10 %
fetálního bovinního séra (fetal bovine
serum – FBS) při 37 °C a 5% CO₂. Buňky byly
transfekovány s využitím polyethylen-
iminu (PEI) specifickými oligonukleotidy
(miRVana microRNA), které napodobují
(miR-34c mimic, kat. číslo – 4464066) nebo
inhibují endogenní miRNA (miR-34c
inhibitor, kat. číslo – 4464084). V prvním
kroku transfekce bylo smícháno bezsé-
rové médium s oligonukleotidy a k nim
se pak přidal PEI. Po 15min inkubaci
za pokojové teploty se směs přikapala
k buňkám.

Klinický materiál

V rámci studie bylo analyzováno celkem
74 vzorků – 39 pocházelo z dysplastické
a 35 z přilehlé normální tkáně děložního
hrdla. Jednalo se o vzorky z konizací pro-
váděných v letech 2011–2014. Všechny
pacientky podepsaly informovaný sou-
hlas s využitím klinického materiálu k vě-
deckým účelům.

Kvantifikace nukleových kyselin

Celková RNA byla izolována z buněk po-
mocí TRIZOL reagentu (VWR). Po izolaci
RNA byla stanovena její čistota a kon-
centrace pomocí spektrometru Na-
noDrop 1000. Pro určení čistoty byl sta-
noven poměr absorbancí A_{260nm}/A_{280nm}

a pouze RNA, u kterých byl poměr v rozmezí hodnot 1,9–2,1, pak byly přepsané (10 ng RNA) do cDNA pomocí kitu (TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit) s využitím specifických primerů pro miR-34c (Applied Biosystems). Kapková digitální polymerázová řetězová reakce (droplet-digital polymerase chain reaction – ddPCR) byla použita pro absolutní kvantifikaci molekul nukleových kyselin. Vzorky cDNA byly smíchány s fluorescenčními sondami (TaqMan MicroRNA Assays, Applied Biosystems), mastermixem (ddPCR Supermix for Probes, Bio-Rad) a olej (ddPCR Droplet Generation Oil for Probes, Bio-Rad). Pomocí generátoru mikrokapek (QX200 droplet generátor, Bio-Rad) se vytvořily olejové mikrokapky, které pak byly podrobeny PCR reakci dle instrukcí výrobce. Mikrokapky byly následně analyzovány fluorescenčním detektorem (QX200 droplet reader, Bio-Rad).

Analýza buněčné proliferace

Transfekované buňky byly po 24hod inkubaci spočítány a přesný počet buněk (5 000) byl nanesen na jamku 96jamkové desky. Buňky byly kultivovány dalších 24 hod, médium následně odsáto a buňky promyty. Poté byly buňky fixovány a obarveny ve fixačně-barvicím roztoku složeném z formaldehydu, metanolu a krystalové violeti po dobu přibližně 20 min. Po odstranění zbytku barvicího roztoku byly buňky promyty vodou a vysušeny. Obarvené buňky byly rozpuštěny v 2% dodecylsíranu sodném (SDS) a modré zbarvení bylo měřeno spektrofotometricky při vlnové délce

595 nm. Měření proliferace bylo opakováno ve 3 nezávislých opakováních.

„Scratch“ test

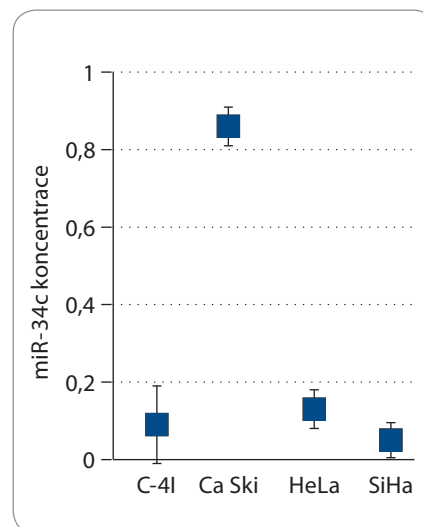
Buňky byly 24 hod po transfekci nasaženy na 6jamkovou desku tak, aby se vytvořila konfluentní vrstva buněk, ve které byla vytvořena rýha pomocí plastové špičky. Postupné zacelování rýhy bylo pozorováno pod mikroskopem, snímáno každé 4 hod a následně vyhodnoceno pomocí Tscratch software [10] (CSElab, ETH). Byly provedeny vždy celkem 3 nezávislé experimenty.

Western blotting analýza

Buňky byly po transfekci lyzovány v lizačním pufru, který obsahoval NP-40 detergent, proteázové a fosfatázové inhibitory. Proteiny byly separovány pomocí SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy a poté přeneseny na nitrocelulóзовou membránu. Cílové proteiny byly detekovány pomocí specifických primárních protilátek rozeznávajících – p21 (118, vlastní), p53 (DO-1, vlastní), aktin (Santa Cruz Biotechnology), MDM2 (2A9, vlastní) a následně vhodných sekundárních protilátek (Santa Cruz Biotechnology, USA) konjugovaných s peroxidázou. Signály navázané protilátky byly detekované pomocí chemiluminiscence.

Statistika

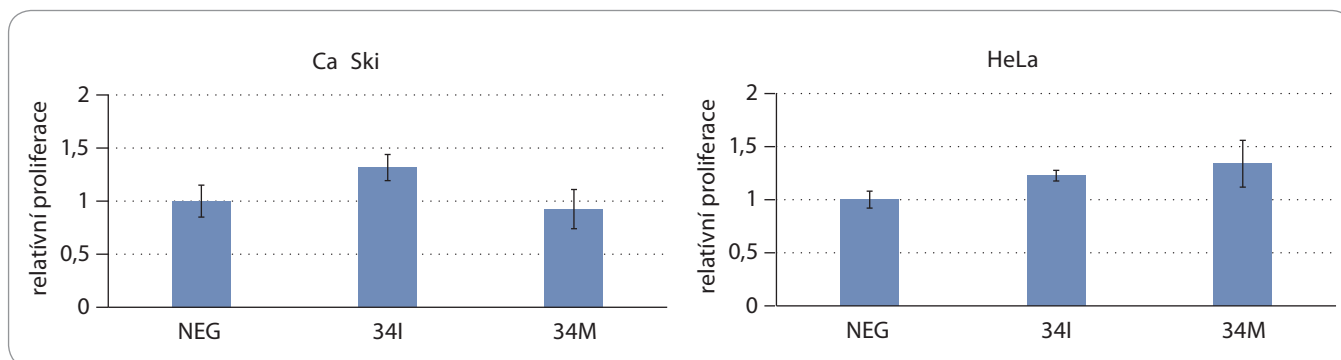
Komparativní analýza exprese miRNA pocházející z prekanceróz děložního hrdla vzhledem ke kontrolám tvořeným přílehlými netransformovanými tkáněmi byla provedena pomocí neparametrického Mann-Whitney U testu.



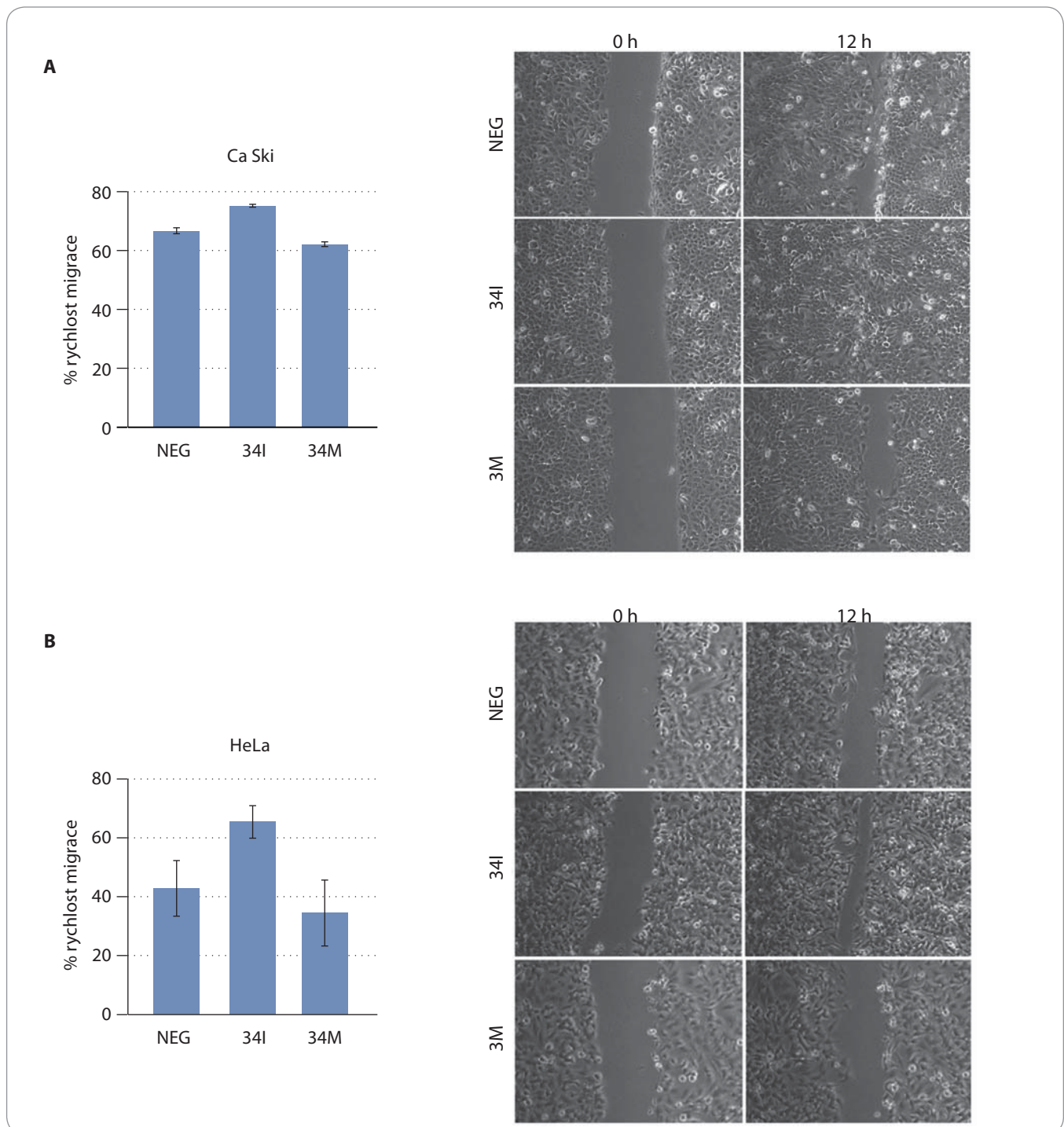
Graf 1. Pomocí ddPCR byl stanoven absolutní počet kopií miR-34c vzhledem k dané reakční směsi (koncentrace) na panelu cervikálních buněčných linií, které jsou k dispozici na pracovišti RECAMO. ddPCR – kapková digitální polymerázová řetězová reakce

Výsledky

Na panelu čtyř nádorových buněčných linií odvozených od cervikálního karcinomu byla pomocí ddPCR stanovena hladina miR-34c. Nejvyšší hladina miRNA byla detekována u buněčné linie Ca Ski, a to téměř desetinasobně vyšší v porovnání s ostatními testovanými buněčnými liniemi (graf 1). Znatelně nižší hladina miR-34c byla pozorována u HPV18+ buněčných linií HeLa a C-4I. U buněčné linie SiHa se exprese miR-34c pohybovala na hranici limitu detekce. Pro další studium byla vybrána HPV16+ buněčná linie Ca Ski, vykazující nejvýraznější



Graf 2. Stanovení proliferace u buněčných linií Ca Ski a HeLa. Celkem 24 hod po transfekci byly buňky barveny pomocí krystalové violeti s následným spektrofotometrickým stanovením intenzity fialového zbarvení, které je přímo úměrné množství buněk. NEG – negativní kontrola (buňky transfekované nespecifickým oligonukleotidem)



Obr. 1. Analýza buněčné migrace. Celkem 36 hod po transfekci 34I nebo 34M byla stanovena schopnost buněk Ca Ski (A) a HeLa (B) migrovat pomocí scratch testu. Jako kontrola (NEG) sloužily buňky transfekované nespecifickými oligonukleotidy. Experiment byl proveden 3× s podobným výsledkem.

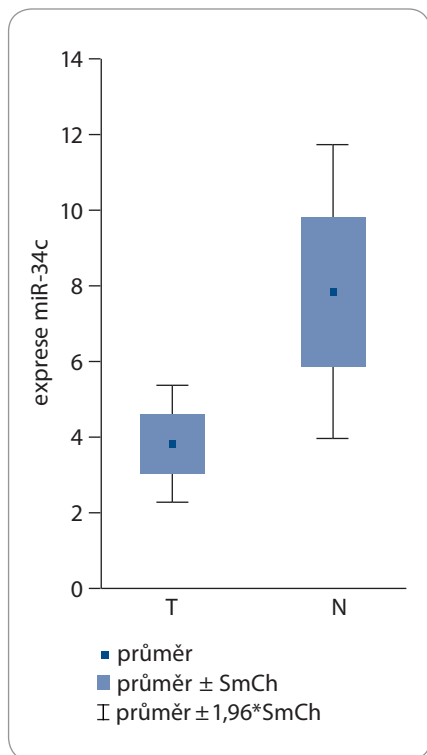
NEG – negativní kontrola (buňky transfekované nespecifickým oligonukleotidem)

expresi miR-34c, a buněčná linie HeLa jako představitel HPV18+ buněk.

V rámci funkční analýzy úlohy miR-34c během maligní transformace a progresse cervikálního karcinomu byl do nádoro-

vých buněk vnesen buď specifický inhibitor miR-34c (34I) s cílem redukovat expresi endogenní miR-34c, nebo naopak specifický oligonukleotid mimikující přítomnost miR-34c (34M). Následně

stanovení proliferace u buněčných linií Ca Ski a HeLa ukázalo, že v případě inhibice miR-34c lze u obou buněčných linií pozorovat obdobný trend, neboť buňky transfekované 34I vykazovaly v prov-

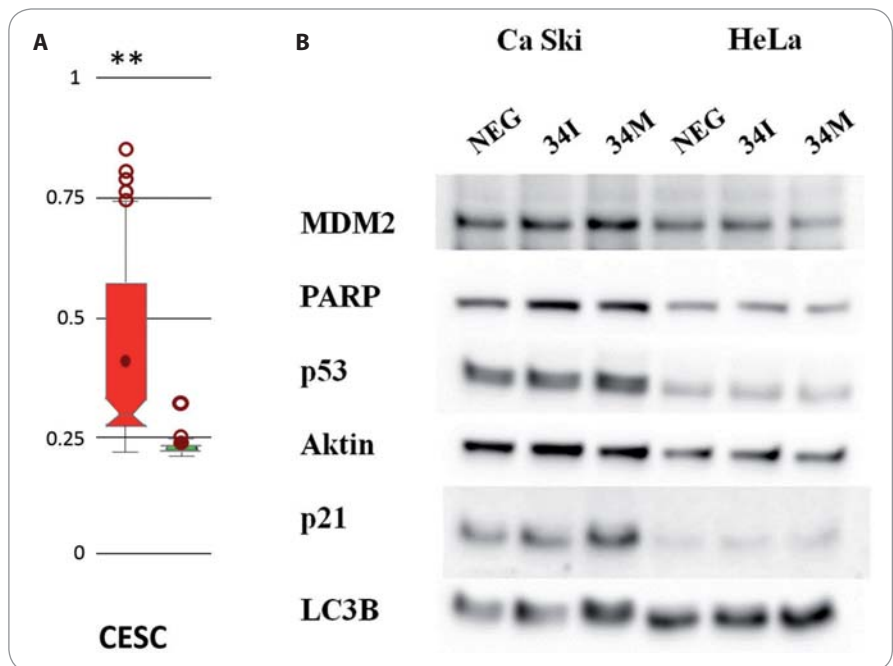


Graf 3. Komparativní analýza hladiny miR-34c u cervikálních prekanceróz (T) a přilehlé netransformované tkáně (N).

nání s kontrolními buňkami intenzivnější proliferaci (graf 2). V případě transfekce 34M nebyly výsledky konzistentní. Buněčná proliferace byla měřena také po 36 a 48 hod s podobným výsledkem.

Možnost, že se miR-34c nějakým způsobem účastní mechanismů zodpovědných za citlivost/resistenci nádorových buněk karcinomu děložního hrdla k chemoterapeutikům, byla analyzována pomocí testu viability (MTT test). Buňky transfekované 34I nebo 34M byly vystaveny působení cytostatik běžně používaných při chemoterapii, konkrétně topotekanu, cisplatině a paklitaxelu. Bylo však zjištěno, že změna v hladině miR-34c zásadním způsobem neovlivnila citlivost buněk odvozených od cervikálního karcinomu k testovaným cytostatikům (data neuvedena).

Vliv miR-34c na buněčnou migraci byl stanoven pomocí tzv. scratch testu. Buňky transfekované 34I migrovaly výrazně rychleji než kontrolní buňky (obr. 1). Naproti tomu buňky transfekované 34M sloužícím jako umělá exo-



Obr. 2. A) Analýza metylací promotoru miR-34c s využitím online databáze MethHC. Intenzita metylace promotoru pro miR-34c byla porovnáвана mezi vzorky pocházejícími ze souboru CESC a zdravými kontrolami (vlevo); ** $p < 0,005$. B) Imunochemická analýza změn exprese vybraných proteinů po transfekci buněk Ca Ski a HeLa inhibito-rem miR-34c (34I) a miR-34c mimikujícími oligonukleotidy (34M).

CESC – cervikální spinocelulární karcinom a endocervikální adenokarcinom

genní miRNA vykazovaly pomalejší migraci. Z těchto výsledků je patrné, že miR-34c se v epiteliálních buňkách děložního hrdla přímo podílí na inhibici buněčné migrace.

Tumor supresorovou úlohu miR-34c potvrzují i výsledky analýzy prekanceróz pocházejících z děložního hrdla. Konkrétně byla hladina miR-34c stanovena u 39 HSIL a u 35 přilehlých netransformovaných tkání. Z grafu 3 je patrné, že exprese miR-34c byla u dysplazií signifikantně snížena ($p < 0,01$) v porovnání s přilehlou zdravou tkání.

S cílem nastínit mechanismus, který by se mohl uplatňovat při regulaci exprese miR-34c, bylo použito srovnání sekvencí s on-line databází MethHC [11]. Zřetelně se ukázalo, že ve vzorcích pocházejících z nádorových tkání dochází často k hypermetylacii promotoru pro miR-34c v porovnání s kontrolními zdravými tkáněmi (obr. 2A). Na základě již publikovaných článků, které úzce propojují miR-34c a p53, jsme sledovali, zda budou mít změny v hladině miR-34c vliv na expresi p53 a jeho cílových molekul.

Imunochemická detekce prokázala, že po transfekci Ca Ski buněk 34M došlo k mírné indukci exprese MDM2, p53, p21 i LC3b, zatímco transfekce 34I neměla žádný efekt (obr. 2B).

Diskuze

miRNA hrají důležitou úlohu v řadě patologických procesů, vč. maligní transformace. Mnoho prací se zabývá studiem odlišné exprese miRNA v nádorových a přilehlých nenádorových tkáních se záměrem objevit miRNA, které by mohly sloužit jako biomarkery nebo konkrétní cíle využitelné při léčbě nádorových onemocnění.

Tumor supresorová úloha rodiny miR-34, jež je tvořena miR-34a/b/c, byla prokázána v řadě studií zabývajících se funkcí této miRNA u nádorových onemocnění, konkrétně se jedná o některé epiteliální nádory (karcinom plic, slinivky břišní, mléčné žlázy, prostaty, žaludku, vaječníků, střeva a konečníku), melanomy, neuroblastomy, leukemie a sarkomy [12]. Bylo zjištěno, že hladina těchto miRNA je regulována proteinem

p53, který indukuje jejich expresi při genotoxickém stresu obvykle vedoucím k poškození DNA [13]. V návaznosti na zvýšenou expresi rodiny miR-34 pak obvykle dochází k indukci apoptózy a buněčné senescence. Nejznámějším zástupcem rodiny miR-34 je miR-34a, v případě této miRNA bylo popsáno snížení hladiny i u karcinomu děložního hrdla v porovnání s přílehlými netransformovanými tkáněmi, a to hned v několika nezávislých studiích [14,15]. Stran miR-34c a cervikálních malignit jsou stávající literární zdroje značně omezenější. Expresním profilováním cervikálních prekanceróz a hierarchickou klastrovou analýzou bylo identifikováno 12 odlišně regulovaných miRNA, vč. miR-34c. Studie deklaruje, že na základě identifikovaného panelu miRNA je možné rozlišit, zda se jedná o dysplastický epitel, nebo normální tkáň [16].

V naší práci jsme se zaměřili na validaci úlohy miR-34c jako nádorového supresoru a na možnosti jejího využití při detekci cervikálních dysplazií. miR-34c potvrdila svůj diskriminační potenciál při expresní analýze, která prokázala její sníženou hladinu u prekanceróz ve srovnání s kontrolní netransformovanou tkání. Současně tato miRNA vykazovala rysy nádorového supresoru, neboť se při funkčních analýzách na modelových buněč-

ných liniích odvozených od cervikálního karcinomu podílela na inhibici buněčné proliferace a schopnosti buněk migrovat. Tyto výsledky potvrzují důležitou úlohu miR-34c v patogenezi a progresi cervikálních malignit na molekulární úrovni a naznačují možnosti jejího budoucího využití v onkogynekologické praxi.

Závěr

Funkční analýza exprese miR-34c v lidských nádorových buněčných liniích odvozených od karcinomu děložního hrdla prokázala tumor supresorovou úlohu této miRNA. Signifikantní rozdíl v hladině miR-34c mezi HSIL a normálním dlaždicobuněčným cervikálním epitelem, kde je exprese miR-34c výrazně vyšší, zřetelně dokresluje význam miR-34c při karcinogenezi děložního hrdla.

Literatura

1. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2013; 16 (1): 1–17.
2. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007; 370(9590): 890–907. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61416-0.
3. Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(1): 60–66.
4. Matoulkova E, Michalova E, Vojtesek B et al. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol* 2012; 9 (5) 563–576. doi: 10.4161/rna.20231.
5. Michalova E, Vojtesek B, Hrstka R. Impaired pre-mRNA processing and altered architecture of 3' untransla-

- ted regions contribute to the development of human disorders. *Int J Mol Sci* 2013; 14 (8): 15681–15694. doi: 10.3390/ijms140815681.
6. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 2012; 13 (4): 271–282. doi: 10.1038/nrg3162.
7. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2017; 9 (6) 852. doi: 10.15252/emmm.201707779.
8. Bommer GT, Gerin I, Feng Y. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 2007; 17(15): 1298–1307. doi: 10.1016/j.cub.2007.06.068.
9. Siemens H, Jackstadt R, Hunten S. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle* 2011; 10(24): 4256–4271. doi: 10.4161/cc.10.24.18552.
10. Geback T, Schulz MM, Koumoutsakos P et al. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques* 2009; 46 (4): 265–274. doi: 10.2144/000113083.
11. Huang WY, Hsu SD, Huang HY et al. MethHC: a database of DNA methylation and gene expression in human cancer. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: D856–D861. doi: 10.1093/nar/gku1151.
12. Wong MY, Yu Y, Walsh WR et al. microRNA-34 family and treatment of cancers with mutant or wild-type p53 (Review). *Int J Oncol* 2011; 38(5): 1189–1195. doi: 10.3892/ijo.2011.970.
13. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 2010; 17 (2): 193–199. doi: 10.1038/cdd.2009.56.
14. Li B, Hu Y, Ye F. Reduced miR-34a expression in normal cervical tissues and cervical lesions with high-risk human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Cancer* 2010; 20 (4): 597–604. doi: 10.1111/IGC.0b013e3181d63170.
15. Ribeiro J, Sousa H. MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a. *Mol Biol Rep* 2014; 41(3): 1525–1531. doi: 10.1007/s11033-013-2998-0.
16. Cheung TH, Man KN, Yu MY. Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm. *Cell Cycle* 2012; 11(15): 2876–2884. doi: 10.4161/cc.21278.

Circulating Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets in Patients with Colorectal Cancer – Exploratory Analysis of Their Biomarker Potential

Subpopulace cirkulujících myeloidních supresových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem – explorativní analýza jejich potenciálu jako biomarkeru

Fědorová L.^{1,2}, Pilátová K.^{1,2}, Selingerová I.^{1,2}, Bencsiková B.^{2,3}, Budinská E.², Zwinsová B.², Brychtová V.², Langrová M.², Šefr R.^{2,4}, Valík D.^{1,2}, Zdražilová Dubská L.^{1,2}

¹ Department of Laboratory Medicine, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

² Regional Centre for Applied Molecular Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

³ Clinic of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

⁴ Clinic of Surgical Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

Summary

Background: Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) contribute to tumor escape from host immune surveillance and to tumor progression by producing tumor-promoting factors. We focused on clinical and analytical MDSCs-related issues as potential biomarkers and immune regulators involved in tumor progression. **Patients and Methods:** We analyzed 10 patients with advanced colorectal carcinoma (CRC) with (M1 subgroup) or without (M0 subgroup) distant metastases at diagnosis. Peripheral blood was collected at diagnosis prior to treatment and subsequently 12 months after therapy initiation. Using multicolor flow cytometry MDSC subsets were evaluated. Monocytic MDSCs (M-MDSCs) were detected as CD45⁺ CD11b⁺ CD33⁺ HLA-DR^{low/-} CD14⁺ CD15⁻, granulocytic MDSCs (CD33^{hi} PMN-MDSC) were detected as CD45⁺ CD11b⁺ CD33^{hi} HLA-DR^{low/-} CD14⁻ CD15⁺. For analytical and preanalytical studies, random fresh blood specimens predominantly from cancer patients were analyzed. **Results:** Levels of circulating M-MDSCs were not associated with metastatic disease within advanced CRC patients. Levels of circulating CD33^{hi} PMN-MDSCs were elevated in patients with distant metastases compared to T3 M0 subgroup. Circulating M-MDSCs increased upon treatment initiation in 9 out of 10 patients. CD33^{hi} PMN-MDSCs substantially dropped upon treatment initiation in 5 out of 10 patients and substantially increased in 2 out of 10 patients. Analytical part showed that absolute and relative counts within each MDSC subset are correlated. Coefficient of variation (CV) for repeatability was 6–11% for M-MDSCs and 25–44% for CD33^{hi} PMN-MDSCs. CV for reproducibility was higher with 8–22% for M-MDSCs and 35–79% for CD33^{hi} PMN-MDSCs demonstrating that delay in measurement of MDSCs in whole blood specimen may distort quantification of circulating MDSC subsets. **Conclusion:** The quantification of MDSC subsets is substantially dependent on the type of specimen examined and its preanalytical processing. Exploratory analysis of M-MDSCs and CD33^{hi} PMN-MDSCs in CRC patients revealed different dynamics of M-MDSC and CD33^{hi} PMN-MDSC subsets in the context anti-cancer treatment.

Key words

myeloid-derived suppressor cells – preanalytics – colorectal cancer – flow cytometry – immune monitoring

The work was supported by Czech Ministry of Health (projects AZV 16-31966A and DRO 00209805) and Czech Ministry of Education, Youth and Sports (projects LO1413, LM2015089).

Tato práce byla podpořena MZ ČR (projekt AZV 16-31966A a DRO 00209805) a MŠMT ČR (projekt LO1413, LM2015089).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. RNDr. Lenka Zdražilová
Dubská, Ph.D.

Department of Laboratory Medicine
Masaryk Memorial Cancer Institute
Zluty kopec 7
Brno 656 53
Czech Republic
e-mail: dubska@mou.cz

Přijato/Accepted: 30. 8. 2017

doi: 10.14735/amko20182588

Souhrn

Východiska: Myeloidní supresorové buňky (MDSCs) přispívají k úniku nádoru imunitní kontrole a podporují nádorový růst produkci růstových faktorů. Zaměřili jsme se na klinické a analytické otázky týkající se MDSCs jako potenciálních biomarkerů a imunitních regulátorů, které se podílejí na progresi nádoru. **Soubor pacientů a metody:** Analyzovali jsme skupinu 10 pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem (colorectal carcinoma – CRC) a přítomnými metastázami (podskupina M1), nebo bez metastáz (podskupina M0) v době diagnózy. Krev byla pacientům odebrána v době diagnózy před zahájením protinádorové léčby a dále 12 měsíců po zahájení léčby. Fluorescenční imunoanalýzou na průtokovém cytometru byly detekovány subpopulace MDSCs – monocytární MDSC (M-MDSCs) s imunofenotypem CD45⁺ CD11b⁺ CD33⁺ HLA-DR^{low/-} CD14⁺ CD15⁻ a granulocytární MDSC (CD33^{hi} PMN-MDSC) s imunofenotypem CD45⁺ CD11b⁺ CD33^{hi} HLA-DR^{low/-} CD14⁻ CD15⁺. V preanalytické a analytické části studie byly změřeny náhodně vybrané vzorky krve pacientů s onkologickou diagnózou. **Výsledky:** Hladina cirkulujících M-MDSCs není asociována s metastatickým CRC. Naopak cirkulující CD33^{hi} PMN-MDSCs byly zvýšeny u pacientů se vzdálenými metastázami (M1) v porovnání s T3 M0 podskupinou. Cirkulující M-MDSCs byly zvýšeny po podání chemoterapeutické léčby u 9 z 10 pacientů. CD33^{hi} PMN-MDSCs značně poklesly po zahájení léčby u 5 z 10 pacientů a byly zvýšeny u 2 z 10 pacientů. Absolutní a relativní počty MDSCs spolu korelovaly a oba mohou být použity pro kvantifikaci MDSCs. Variační koeficient (CV) opakovatelnosti byl 6–11 % pro M-MDSCs a 25–44 % pro CD33^{hi} PMN-MDSCs. CV mezi-lehlé preciznosti byl vyšší – 8–22 % u M-MDSCs a 35–79 % u CD33^{hi} PMN-MDSCs, což ukazuje, že časová prodleva měření MDSCs ve vzorku plně krve ovlivňuje množství detekovaných MDSCs. **Závěr:** Kvantifikace subpopulací MDSC je závislá na typu zkoumaného vzorku a jeho preanalytickém zpracování. Explorativní analýza M-MDSCs a CD33^{hi} PMN-MDSCs u pacientů s CRC ukázala, že dynamika cirkulujících MDSCs před a po podání protinádorové léčby je odlišná s ohledem na konkrétní subset myeloidních supresorových buněk.

Klíčová slova

myeloidní supresorové buňky – preanalytika – kolorektální karcinom – průtoková cytometrie – imunomonitoring

Introduction

Cancer development is caused by accumulation of intrinsic cellular changes that are shaped by host-related factors such as inflammatory cells and cytokine/chemokine levels in the tumor macro and microenvironment. Chronic inflammation supports cancer angiogenesis, glycolytic phenotype and Th2 immune response and thus contributes to cancer progression [1,2].

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are regulatory myeloid cells with capability to inhibit T-cell effector functions. MDSCs can elicit their immunosuppressive functions by various mechanisms relying on production of 1. immunoregulatory enzymes, such as arginase-1, indoleamine 2,3 dioxygenase and nitric oxide synthase 2; 2. reactive oxygen species and 3. suppressive cytokines, such as TGFβ, IL-10 and IL-8. The latter is associated with tolerogenic action of MDSCs leading to T-cell tolerogenic phenotype or Treg cell expansion.

In recent years, MDSCs were studied in the context of tumor growth where they contribute to tumor escape from the host immune surveillance [3] and in the context of their targeting by anticancer therapeutics. Association between increased circulating MDSC number and worse prognosis has been reported across various cancer types (summarized and reviewed in [4]).

In humans, MDSC are characterized as CD33⁺ cells, common myeloid marker, and CD11b⁺ with no marker for mature lymphoid or myeloid on their membrane including HLA-DR. Further, MDSCs can be divided into two main groups based on expression CD14 and CD15 as CD14⁺ CD15⁻ monocytic MDSCs (M-MDSCs) and CD14⁻ CD15⁺ granulocytic MDSCs (PMN-MDSCs) [5]. Published data show great variability in immunophenotype of cells evaluated as “MDSCs” in cancer-related studies in humans [4]. Majority of published studies focuses on M-MDSCs or total MDSCs. Granulocytic fraction of MDSCs can be defined as low density immature myeloid PMN-MDSCs or CD33^{hi} mature presumably activated PMN-MDSCs [1].

We have previously shown increased numbers of circulating M-MDSC in colorectal cancer (CRC) patients compared to control population [6]. In recent work, we focused on MDSC subsets in the clinically relevant context pharmacologically administered G-CSFs [1].

Here, we addressed analytically and clinically relevant issues relating to circulating MDSC subsets as potential cancer biomarkers and immune regulators in cancer patients.

Material and methods

Patients

The CRC group was pilot part of the Colobiome project approved by the

Ethics Board of Masaryk Memorial Cancer Institute (MMCI), Brno, Czech Republic, and all patients signed informed consent for the study. Patients were enrolled to the study at the time of diagnosis of advanced CRC with (M1 subgroup) or without (M0 subgroup) distant metastases at diagnosis. The analysis of circulating MDSC subsets was performed at diagnosis prior treatment and subsequently 12 months after therapy initiation. For analytical and preanalytical studies, random fresh blood specimens predominantly from cancer patients were analyzed.

Circulating MDSC subset detection

Peripheral blood specimens were collected in a 2.6 ml S-Monovette[®] tube with tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid (K3EDTA) anticoagulant in a phlebotomy room in close proximity to the laboratory where the analysis was performed. The blood specimens were mixed for several minutes on the roller mixer. Immediately after that, complete blood count and differential was obtained on Sysmex XE-5000 haematology analyzer. Total white blood cell count was used for calculation of the absolute count of MDSC subsets. MDSC subsets were evaluated within 3 hours after blood withdrawal by Navios flow cytometer and software (Beckman Coulter) by multicolour protocol using

fluorescence-labelled antibodies CD33-FITC, CD14-PE, HLA-DR-PC5, CD11b-APC, CD45-PacBlue, CD15-KrO from Beckman Coulter. M-MDSCs were detected as CD45⁺ CD11b⁺ CD33⁺ HLA-DR^{low/-} CD14⁺ CD15⁻ and CD33^{hi} PMN-MDSC subset was detected as CD45⁺ CD11b⁺ CD33⁺ HLA-DR^{low/-} CD14⁻ CD15⁺. The number of MDSCs was expressed as percentage from total circulating white blood cells and as an absolute MDSC count calculated from total white blood cell count.

Statistical analysis

Wilcoxon test was used to compare medians in two groups. Absolute MDSC counts at diagnosis and after treatment were compared by paired variant of Wilcoxon test. All statistical tests were performed by the R software version 3.5.1. p-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Results and discussion

Circulating MDSC subsets – analytical and preanalytical aspects

Using multicolor immunophenotyping protocol, we enumerated M-MDSCs and CD33^{hi} PMN-MDSCs in fresh peripheral blood specimens. The majority of studies on MDSC in humans are performed using peripheral blood. The number of MDSCs can be reported as absolute cell count per volume of blood or as relative count such as percentage of cell in total white blood cells (WBC) and the latter approach to quantification of circulating MDSC numbers prevails. Here we show that in both MDSC subsets absolute and relative counts are correlated (Fig. 1a) and therefore equal information may be derived from either method of MDSC enumeration.

Quantification of circulating MDSCs may be influenced by several preanalytical and analytical factors. First, for practical reasons, MDSCs are often investigated in cryopreserved separated peripheral blood mononuclear cell (PBMC) specimens. Gradient centrifugation used for PBMC isolation can be expected to deplete PMN-MDSCs together with granulocytes. Moreover, cryopreservation of PBMC samples decreases MDSCs and mainly their

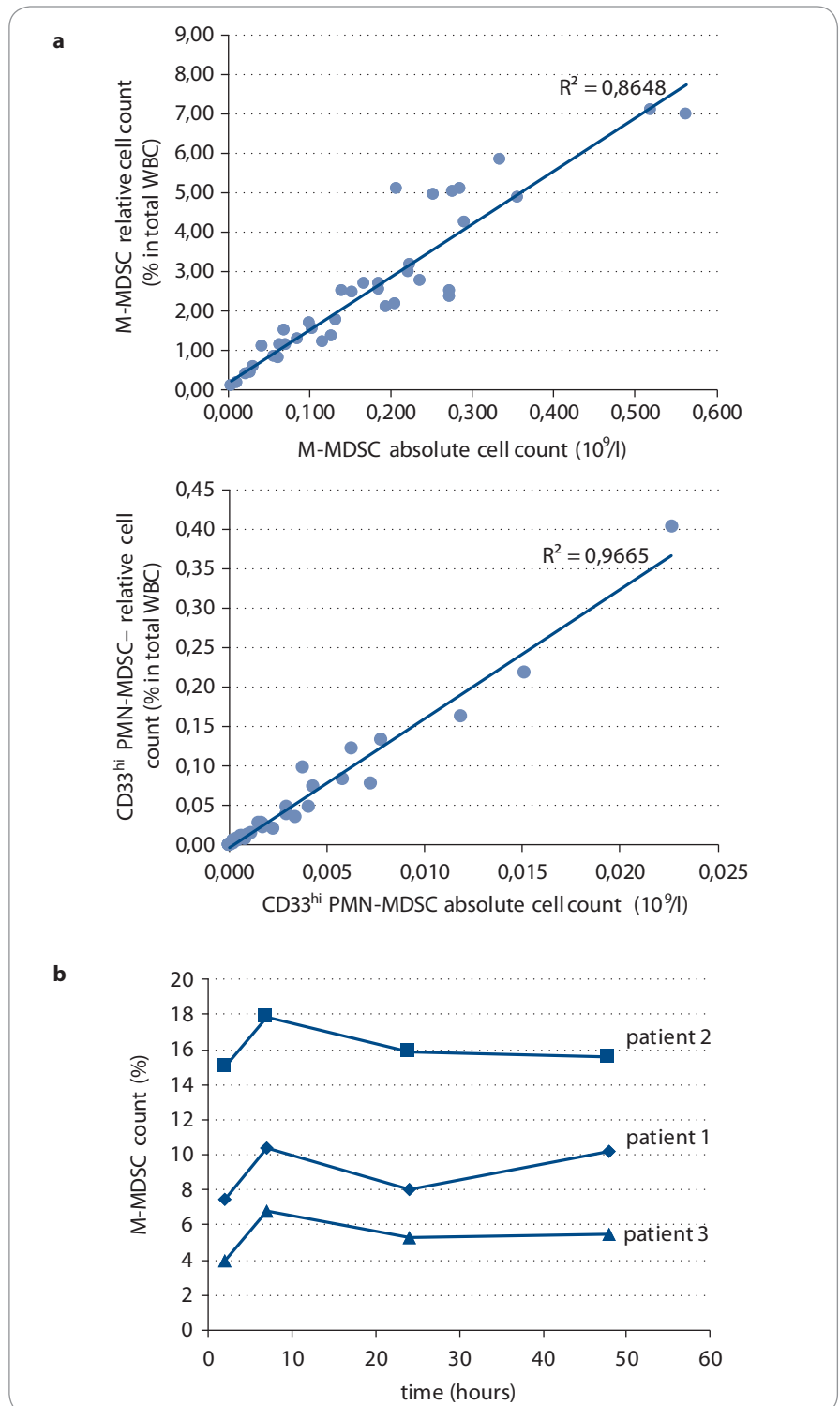


Fig. 1. a) Comparison of relative and absolute MDSC enumeration in peripheral blood. MDSCs were evaluated in 38 samples of peripheral blood withdrawn to K3EDTA from control group and patients with CRC at the time of diagnosis. b) Time-to-analysis related changes of M-MDSC relative count. Measurement of M-MDSCs was performed in three whole blood specimens of CRC patients in 2, 7, 24 and 48 hours from blood collection into K3EDTA.

MDSCs – myeloid-derived suppressor cells, K3EDTA – tripotassium ethylenediamine-tetraacetic acid, M-MDSC – monocytic MDSCs, CRC – colorectal cancer, WBC – white blood cell

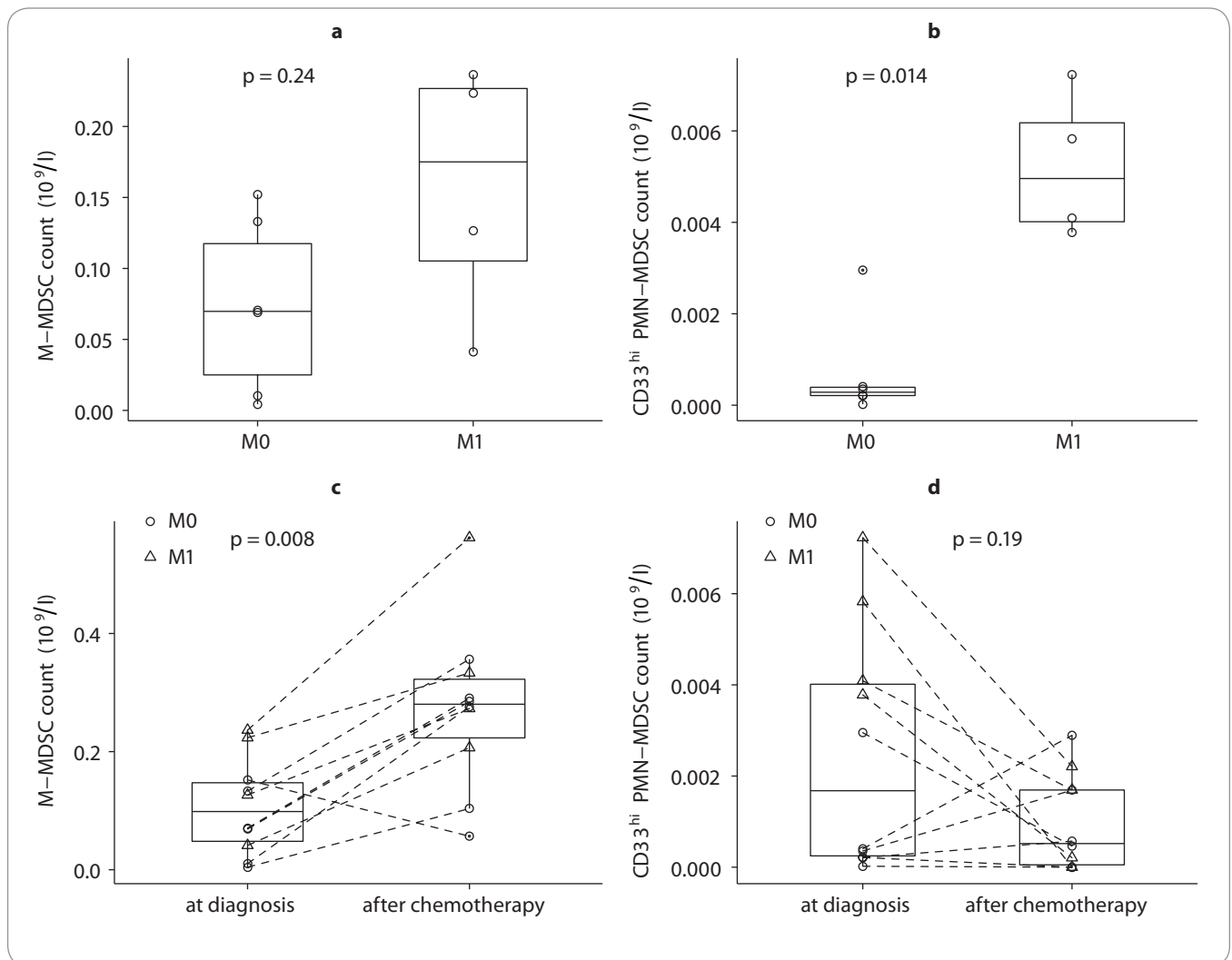


Fig. 2. a) Difference in baseline M-MDSC counts in patients with primary metastatic CRC (M1) and patients without detected metastases (M0) at diagnosis. b) Difference in baseline circulating CD33^{hi} PMN-MDSC counts in colorectal patients with metastatic disease (M1) and advanced CRC without distant metastases (M0) at diagnosis. c) Comparison of absolute circulating M-MDSC count at diagnosis and after chemotherapy initiation in advanced CRC patients. d) Comparison of absolute circulating CD33^{hi} PMN-MDSC count at diagnosis and after chemotherapy initiation in advanced CRC patients.

M-MDSC – monocytic myeloid-derived suppressor cells, CRC – colorectal cancer, CD33^{hi} PMN-MDSC – granulocytic MDSCs

granulocytic subset due to their fragile nature [7,8]. Second, time between blood collection and the measurement probably also influences frequency of circulating MDSCs. However, published data are not consistent in this respect [8,9]. Time-to-analysis related changes in M-MDSC frequency may be caused by adhesion of the monocytic cells to the vial surface or by phenotype changes [8]. Granulocytic cells on the other hand loose viability in the stored blood specimens. We tested analytical variability (measurement precision) of MDSC quantification in

K3EDTA whole blood specimens of CRC patients to assess 1) reproducibility in time and 2) repeatability immediately after blood collection. Repeatability was performed on four independent measurements within 2 hours from blood collection. Reproducibility was performed in subsequent time points – 2, 7, 24 and 48 hours from the blood collection while storing blood specimen at 2–8 °C. Coefficient of variation (CV) for repeatability was 6–11% for M-MDSCs and 25–44% for CD33^{hi} PMN-MDSCs. CV for reproducibility was higher with 8–22% for M-MDSCs and 35–79% for

CD33^{hi} PMN-MDSCs demonstrating that delay in measurement of MDSCs in whole blood specimen may distort quantification of circulating MDSC subsets. M-MDSCs are defined and detected as HLA-DR^{-/low+} cells and expression of this marker is vulnerable to the down and up-regulation on cell surface upon blood collection into anticoagulants [10]. We observed transient increase of M-MDSC in K3EDTA-anticoagulated whole blood specimen in the time point 7 hours from the blood collection that dropped at day 2 and 3 (Fig. 1b). As M-MDSC enumeration is

critically dependent on the expression of HLA-DR molecule on monocytes, the recommendations for preanalytical handling of specimen for HLA-DR/mono analysis should be followed when M-MDSCs are quantified. To detect the level of HLA-DR on monocytes to evaluate the level of immunosuppression in sepsis, it is recommended to perform the cell staining within 2 hours after sampling [11]. Taken together, inconsistency in quantification of CD33^{hi} PMN-MDSCs related to delay from blood collection to analysis is likely to be attributed to fragility of granulocytic cells and to some extent also by unspecific binding of antibodies to decayed non-viable cells. The main cause in variation in M-MDSC count within time to analysis of whole blood is caused by *ex vivo* changes in HLA-DR surface expression. We conclude that a laboratory providing quantification of circulating MDSC subsets in peripheral blood should develop robust and consistent approach to preanalytics not only in term of the type of anticoagulants used for blood collection but also in terms of storage conditions and exact time from the blood collection to analysis.

Circulating MDSC subsets in CRC patients

In our exploratory analysis of 10 patients with advanced CRC treated with standard adjuvant or palliative treatment predominantly with fluoropyrimidines, we observed different therapy-related dynamics in MDSC subsets. Levels of circulating M-MDSCs were not associated with metastatic disease within advanced CRC patients (Fig. 2a). Levels of circulating CD33^{hi} PMN-MDSCs were elevated in patients with distant metastases compared to T3 M0 subgroup (Fig. 2b). Circulating M-MDSCs

increased upon treatment initiation in 9 out of 10 patients (Fig. 2c). CD33^{hi} PMN-MDSCs substantially dropped upon treatment initiation in 5 out of 10 patients and substantially increased in 2 out of 10 patients (Fig. 2d). Therefore, circulating MDSC subsets, namely M-MDSC and CD33^{hi} PMN-MDSCs, revealed unbalanced relation to the disease extent and different time-dependence in the context of anti-cancer therapy, which pointed out that circulating M-MDSCs and CD33^{hi} PMN-MDSCs should not be evaluated as a pooled cell type in clinical cancer research.

It is not yet clear whether elevation of a particular circulating MDSC subsets reflects rather the presence and extent of malignant disease or functional cancer-promoting properties of the tumor, including level of immune suppression and vascular endothelial growth factor stimulation, or the host response to the disease, such as acute-phase marker. Exploring a correlation of circulating MDSC subsets and routinely exploited acute phase marker, C-reactive protein (CRP), we observed that unlike WBC count, number of circulating M-MDSCs or CD33^{hi} PMN-MDSCs was not associated with plasma CRP elevation in CRC patients at the diagnosis (data not shown).

Conclusions

In recent years, scientific interest in the role of immunosuppressive MDSCs in cancer has moved to clinical research and is approaching the clinical practice. Detection of human MDSCs requires multicolor flow cytometry to distinguish MDSC subsets. Beyond the issue of immunophenotypic MDSC definition, the quantification of both M-MDSC and CD33^{hi} PMN-MDSCs is substantially dependent on the type of specimen examined (full blood vs.

isolated and frozen PBMCs) and its preanalytical processing in terms of the delay between blood withdrawal and MDSC enumeration. Analysis of MDSC subsets in CRC patients revealed different dynamics of M-MDSCs and CD33^{hi} PMN-MDSCs in the context anti-cancer treatment and therefore the biomarker potential of MDSC should be explored with respect to distinct MDSC subsets.

References

1. Pilatova K, Bencsikova B, Demlova R et al. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in patients with solid tumors: considerations for granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Cancer Immunol Immunother*. In press 2018. doi: 10.1007/s00262-018-2166-4.
2. Greplova K, Selingerova I, Valik D et al. Lactate Dehydrogenase – old tumour marker in the light of current knowledge and preanalytical conditions. *Klin Onkol* 2017; 30 (Suppl 1): 156–158.
3. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(10): 739–752. doi: 10.1038/nrc3581.
4. Shipp C, Speigl L, Janssen N et al. A clinical and biological perspective of human myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73(21): 4043–4615. doi: 10.1007/s00018-016-2278-y.
5. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(2): 238–244. doi: 10.1016/j.coi.2010.01.021.
6. Pilatova K, Budinska E, Bencsikova B et al. Circulating myeloid suppressor cells and their role in tumour immunology. *Klin Onkol* 2017; 30 (Suppl1): 166–169.
7. Kotsakis A, Harasymczuk M, Schilling B et al. Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples. *J Immunol Methods* 2012; 381(1–2): 14–22. doi: 10.1016/j.jim.2012.04.004.
8. Grutzner E, Stimer R, Arenz L et al. Kinetics of human myeloid-derived suppressor cells after blood draw. *J Transl Med* 2016; 14: 2. doi: 10.1186/s12967-015-0755-y.
9. Florcken A, Takvorian A, Singh A et al. Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma. *Immunol Lett* 2015; 168(2): 260–267. doi: 10.1016/j.imlet.2015.10.001.
10. Docke WD, Hoflich C, Davis KA et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 2005; 51(12): 2341–2347. doi: 10.1373/clinchem.2005.052639.
11. Monneret G, Venet F. Monocyte HLA-DR in sepsis: shall we stop following the flow? *Crit Care* 2014; 18(1): 102. doi: 10.1186/cc13179.

Současné metody analýzy mikroRNA

Current Methods of microRNA Analysis

Bartošík M., Jiráková L.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: mikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující molekuly RNA regulující genovou expresi vazbou na mRNA. Ovlivňují řadu fyziologických procesů, vč. buněčné proliferace, diferenciace nebo apoptózy, a mají tak výrazný vliv na vývoj nádorových i jiných onemocnění. Představují proto slibnou skupinu nádorových biomarkerů využitelných např. v časné diagnostice, v predikci odpovědi na léčbu, při záchytu relapsu nebo při klasifikaci nádorů do molekulárních subtypů. **Cíl:** Detekce miRNA vyžaduje různé sofistikované strategie zejména kvůli jejich krátké délce, značné sekvenční podobnosti mezi miRNA patřící do stejné rodiny, i pro jejich často velmi nízkou hladinu ve studovaném vzorku. V této práci jsou zmíněny standardně používané metody, např. reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí, microarrays nebo sekvenování nové generace, a rovněž jsou porovnány různé komerčně dostupné sady pro detekci miRNA. Hlavní důraz je kladen na nově vyvíjené technologie a metody, které by mohly současnou analýzu zlevnit nebo urychlit. Představeny jsou např. alternativní amplifikační techniky (izotermální amplifikace, hybridizační řetězová reakce), různé typy nanomateriálů, speciální proteiny se schopností vázat miRNA, a řada biosenzorů využívající optickou nebo elektrochemickou detekci. **Závěr:** Důležitost miRNA vedla k obrovskému nárůstu počtu nově vyvíjených metod. Většina z nich ovšem nebyla testována na klinickém materiálu, takže je těžké určit jejich eventuální aplikovatelnost do praxe. Pro komerční využití nových metod bude proto nutné provést jejich přísnou validaci pomocí standardních metod nejenom na modelových systémech, ale zejména u klinických vzorků.

Klíčová slova

mikroRNA – regulace genové exprese – nádorové biomarkery – RT-PCR – biosenzory

Summary

Background: MicroRNA (miRNA) are a class of short non-coding RNA molecules that regulate gene expression at the post-transcription level by binding to mRNA. By affecting many physiological processes, including cellular proliferation, differentiation, and apoptosis, they have a major impact on the development of cancer as well as other diseases. Hence, miRNAs could serve as potential tumor biomarkers in e.g. early diagnostics, predicting responses to therapy, monitoring relapse, and molecular classification of tumors. Aim: miRNA detection requires various sophisticated strategies due to the small size, sequence similarity among family members, and often very low levels of miRNAs in analyzed samples. This review describes standard techniques of miRNA detection, such as the reverse transcriptase polymerase chain reaction, microarrays, and next-generation sequencing, and compares several commercially available detection kits. Major emphasis is given to newly developed technologies and methods, which could make the analysis cheaper and quicker. We present, for instance, alternative amplification techniques (isothermal amplification and the hybridization chain reaction), different types of nanomaterials, special proteins used in miRNA analysis, and a number of biosensors utilizing optical or electrochemical detection. **Conclusion:** The importance of miRNA has led to a huge increase in the number of new methods. Most of them, however, have not been tested on clinical material, and thus it is difficult to assess their potential usefulness in routine practice. Their commercial application strongly depends on strict validation with standard techniques using not only model systems, but also clinical samples.

Key words

mikroRNA – gene expression regulation – tumour biomarkers – reverse transcription PCR – biosensors

Práce byla podpořena grantem MŠMT – NPU I – LO1413 a GAČR 17-08971S.

This work was supported by MEYS – NPS I – LO1413 and GAČR 17-08971S.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Martin Bartošík, Ph.D.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: martin.bartosik@mou.cz

Přijato/Accepted: 9. 7. 2018

doi: 10.14735/amko20182593

Úvod

O důležitosti a významu mikroRNA (miRNA) již dnes není pochyb. Tyto krátké nekódující molekuly RNA s průměrnou délkou 22 bází kontrolují expresi mnoha proteinů, a ovlivňují tak řadu fyziologických procesů, jako je buněčná proliferace, diferenciace, apoptóza, vývoj a růst orgánů, imunita nebo metabolismus [1]. Od objevu první miRNA v háďátku obecném (*Caenorhabditis elegans*) uplynulo už čtvrtstoletí [2], během kterého přibýlo do celosvětové databáze těchto molekul, známé jako miRBase [3], přes 38 000 nových sekvencí (verze 22, 04/2018), z toho bezmála 2 000 lidských miRNA. Když v roce 2002 skupina profesora Croceho učinila významný objev popisující deregulaci miR-15 a miR-16 u chronické lymfocytární leukemie [4], odstartovala se tím doslova nová éra výzkumu miRNA jakožto potenciálních biomarkerů nádorových onemocnění.

Vznik nové miRNA neboli tzv. biogeneze probíhá v několika krocích: 1. syntéza dlouhých primárních transkriptů (pri-miRNA) z nekódujících oblastí DNA pomocí RNA polymerázy II; 2. jaderné štěpení pri-miRNA pomocí endonukleázy Droscha na cca 60–70 nukleotidů dlouhou vlásečkovou RNA známou jako pre-miRNA; 3. transport pre-miRNA z jádra do cytoplazmy pomocí exportinu-5; 4. štěpení endonukleázou Dicer, která z pre-miRNA vytvoří krátký duplex miRNA-miRNA* o délce cca 22 bází; 5. vazba duplexu na katalyticky aktivní argonautový (AGO) proteinový komplex, čímž dochází k vyloučení a degradaci miRNA* vlákna za vzniku tzv. RISC komplexu (RNA-induced silencing complex). Jedná se o ribonukleoproteinový komplex obsahující vedoucí vlákno miRNA, odpovědný za samotnou post-transkripční regulaci genové exprese.

Již první publikované výsledky naznačily, že miRNA ovlivňuje genovou expresi vazbou na nepřekládanou oblast na 3' konci mRNA (3' untranslated region – UTR), i když konkrétní mechanismus byl dlouho předmětem diskuzí. V současnosti převažuje model rozštěpení cílové mRNA v případě dostatečné komplementarity miRNA a represe translace, pokud je miRNA komplementární jen

zčásti [5]. Jelikož jsou vazebná místa krátká a nemusí být plně komplementární, je běžné, že jedna miRNA sekvence reguluje translaci stovek mRNA a že translace jedné mRNA může být regulována několika miRNA současně.

Velikostí, chemickým složením i funkcí jsou miRNA velmi blízké jinému typu krátkých nekódujících RNA molekul, a to siRNA (small interfering RNA). Je mezi nimi ovšem několik významných odlišností. Za prvé, geny kódující miRNA jsou odlišné od ostatních kódujících oblastí a z původně jednořetězcového transkriptu vniká úpravami finální miRNA; oproti tomu siRNA pochází z dlouhé dvouřetězcové RNA, často exogenního původu, z transpozónů či virů [6]. Za druhé, sekvence miRNA jsou vysoce konzervovány napříč příbuznými organizmy, zatímco siRNA tuto vlastnost nevykazují. miRNA dále potlačují expresi často nesouvisejících vzdálených genů, kdežto siRNA obvykle ovlivňuje to místo genomu, ze kterého pochází [6].

Jak už bylo zmíněno, funkce miRNA jsou různorodé. Nejjednodušším způsobem, jak určit funkci dané miRNA, je sledovat změnu fenotypu na nižších organizmech po její deregulaci. Příkladem jsou *lin-4* nebo *let-7* u hlístic regulující přechod mezi jednotlivými larválními stadii [7]. Pro většinu miRNA však tyto experimenty chybí, a jejich funkci je proto nutno pouze odhadnout. K tomu slouží různé bioinformatické nástroje predikující cílovou mRNA, na kterou se daná miRNA váže [8], a předpovídající možný účinek miRNA, který se až následně ověřuje experimentálně. Mezi nejznámější bezplatné online nástroje patří miRanda [9], TargetScan [10], miR-Walk [11] nebo miRDB [12].

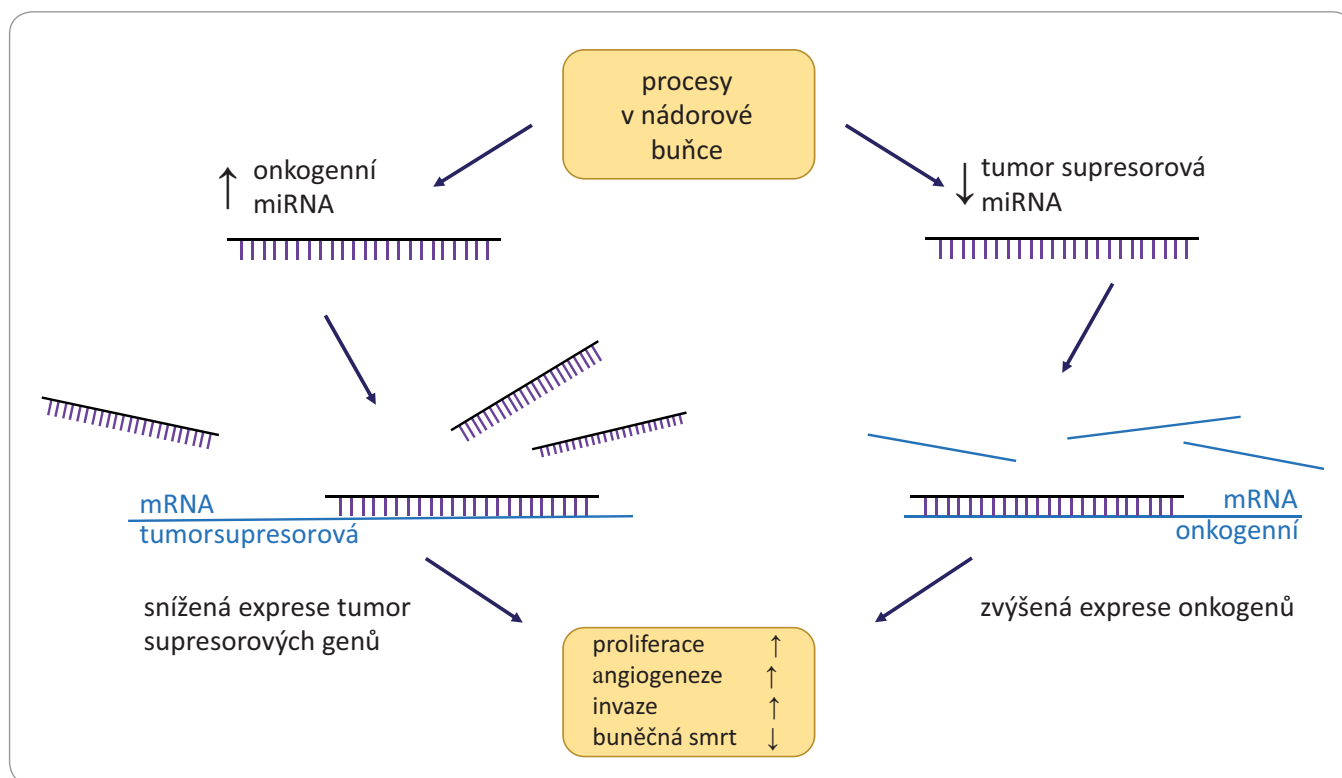
Role miRNA v karcinogenezi

Bylo prokázáno, že miRNA mohou regulovat většinu aspektů maligní transformace, jako je produkce růstových signálů, deregulace buněčného cyklu, blokování apoptózy či podpora angiogeneze a metastazování. Expresí miRNA je tkáňově i nádorově specifická, přičemž abnormální hladiny miRNA v nádorech mají zásadní vliv na vývoj onemocnění [13]. Obecně vzato dělíme miRNA do dvou skupin, a to na tumor

supresorové a onkogenní (obr. 1). Tumor supresorové miRNA tlumí expresi onkogenů, a oproti zdravé tkáni tak mají v nádorech výrazně sníženou hladinu. Příkladem je rodina miR-34, jejímiž cíli jsou transkripty mnoha onkogenů (např. *BCL-2*, *c-MYC* nebo *MDM4*) a která je sama transkripčně regulována nádorovým supresorovým proteinem p53. Mezi tumor supresorové miRNA dále řadíme např. rodiny *let-7* a *miR-200*, které jsou rovněž častým předmětem studií, např. u nádorů prsu a plic [14].

Oproti tomu onkogenní miRNA, jejichž funkcí je inhibice tumor supresorových genů, jsou v nádorech nadměrně exprimovány, a jejich hladiny jsou tudíž vyšší v porovnání se zdravou tkání. Asi nejvíce studovanou onkogenní miRNA je *miR-21*, kódovaná v chromozómalní oblasti 17p23.2. Zvýšená amplifikace této oblasti byla pozorována u řady nádorových onemocnění, především pak nádorů prostaty, vaječníků, prsu nebo plic [15]. Experimentálně pak bylo prokázáno, že při indukci *miR-21* v nádorových modelech (extrahované buňky plicního karcinomu injektované do myši) došlo ke zvýšení tumorigeneze [16]. Dalšími příklady často studovaných onkogenních miRNA jsou *miR-155*, *miR-210* nebo *miR-221* díky jejich zvýšené hladině v nádorech [14].

Z výše uvedeného vyplývá, že miRNA představují velmi slibnou skupinu nádorových biomarkerů, navíc dobře korelujících se známými klinicko-patologickými charakteristikami [13]. Jsou detekovatelné jednak v nádorové tkáni, kde fungují zejména jako prognostické nebo prediktivní biomarkery či zpřesňují molekulární klasifikaci nádorů, tak i v tělních tekutinách (krev, moč, sliny atd.) pro potřeby časné diagnostiky onemocnění nebo záchytu relapsu. Stejně tak se ukazuje důležitost miRNA v patologii solidních nádorů, např. u kolorektálního a renálního karcinomu, nádorů plic a prostaty, melanomu nebo glioblastomu [17], ale i u hematologických malignit [18]. Můžeme se ptát, proč vůbec dochází ke změnám v expresi miRNA v nádorové tkáni. Možností je hned několik – během karcinogeneze může docházet k poškození těch částí chromozomů, které kódují geny pro



Obr. 1. Role miRNA v karcinogenezi.

Vlevo – zvýšená hladina onkogenní miRNA vede ke snížené expresi tumor supresorových genů. Vpravo – snížená hladina tumor supresorových miRNA nedostatečně inhibuje expresi onkogenní.

miRNA [19]; časté jsou i epigenetické mechanismy, např. metylace promotoru genu tumor supresorové miRNA [20]; v neposlední řadě může docházet ke změnám v expresi proteinů účastnících se biogeneze miRNA, jako jsou endonukleázy Drosha nebo Dicer. Snížená exprese těchto proteinů byla zaznamenána především u nádorů se špatnou odpovědí na léčbu.

miRNA by mohla sloužit nejenom jako biomarker, ale i jako potenciální terapeutický cíl nádorových onemocnění. Existují dva přístupy cílené regulace miRNA. První z nich se zaměřuje na snížení hladiny onkogenní miRNA. Označujeme ho jako inhibiční a jeho principem je aplikování látek, tzv. anti-miRs, se sekvencí komplementární k cílové miRNA. Anti-miRs mají strukturu upravenou tak, aby silněji a snadněji vázaly cílové molekuly (jsou to např. uzamčené nukleové kyseliny (locked nucleic acid – LNA)) a současně odolávaly nukleázám vyskytujícím se běžně v těle (modifikace 2-O metylací). Druhým terapeutickým přístupem je umělé zvyšování hladiny tumor

supresorové miRNA, tzv. substituční terapie pomocí miRNA mimics, která má pomoci navodit fyziologický stav. Díky tomu, že se tyto molekuly v těle běžně vyskytují, je pozorováno méně vedlejších účinků než u jiných protinádorových léčiv [21].

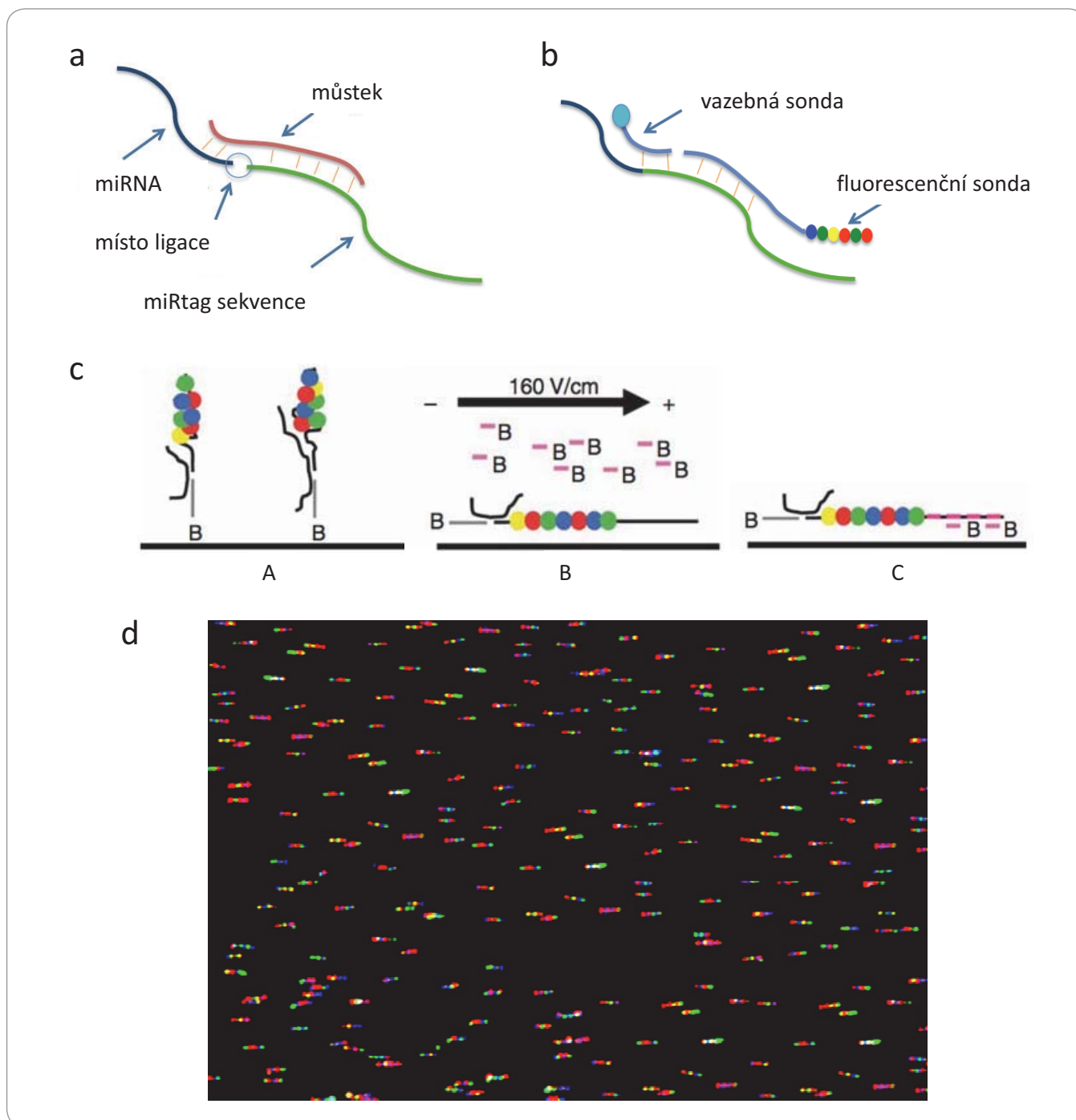
Kromě protinádorové léčby se vývoj léčiv cílených na miRNA zaměřuje také na virová a zánětlivá onemocnění, neurologické a kardiovaskulární poruchy a na onemocnění spojená s poruchami metabolismu. Nejdále je prozatím v testování léčivo Miravirsen (vyvinuto v Santaris Pharma), které potlačuje zvýšenou expresi miR-122 u hepatitidy C a které bylo v roce 2017 testováno v pokročilejší klinické studii fáze II [22].

Standardní metody stanovení miRNA

Při detekci miRNA je potřeba překonat mnohá úskalí. Vzhledem k jejich krátké sekvenci nelze například u polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) použít tradiční primery, neboť jejich sekvence by pokrývaly buď

celou miRNA, nebo by v opačném případě byly značně krátké, a tudíž velmi nespecifické. Další problém spočívá ve značné sekvenci podobnosti mezi miRNA, které patří do stejné rodiny (obvykle vykazují i podobné funkce a rozmístění v genomu [23]). V rámci jedné miRNA rodiny se sekvence často liší pouze jediným nukleotidem, a je proto vyžadována velmi vysoká specifita stanovení. Výzvou může být i velmi nízká hladina hledané miRNA, často nedosahující > 0,01 % z celkové RNA izolované z biologického materiálu [24]. Nicméně stanovení miRNA má i výhody, např. zvýšenou odolnost vůči enzymům degradujícím RNA (RNázám) [25].

V počátcích detekce miRNA se navázalo na již zavedené a běžně používané metody pro analýzu molekul RNA, u nichž byl pouze modifikován postup, a podmínky byly přizpůsobeny krátkým strukturám. Tyto metody jsou ověřené praxí a jsou využívány dodnes (tab. 1). Řadí se mezi ně kvantifikace RNA založená na reverzní transkripci a následně PCR (reverse transcription polymerase



Obr. 2. Princip detekce miRNA pomocí technologie NanoString. miRNA je nejdřív a) spojena ligací s miRtag sekvencí, b) řetězec miRNA-miRtag je hybridizován s vazební a fluorescenční sondou, c) výsledný komplex je pak (A) imobilizován na sklíčku, (B) elektrostatičticky přitažen k povrchu, (C) a 5' konec fluorescenční sondy hybridizován s další biotinylovanou sondou, která zafixuje řetězec v požadované orientaci. Pomocí kamery d) se stanoví umístění a počet jednotlivých fluorescenčních značek.
 Upraveno podle [29] se souhlasem Macmillan Publishers Limited.

chain reaction – RT-PCR). Metoda byla zavedena pro běžnou analýzu transkriptomu a spočívá v přepisu RNA templátu do DNA pomocí reverzní transkriptázy a následné kvantifikaci získané DNA po-

mocí PCR se specificky značenou fluorescenční sondou nebo nespecifickou interkalační barvičkou. Ve výsledku je detekován nárůst fluorescence, z níž je možno při porovnání s hladinou mRNA

tzv. housekeeping genu (genu se stabilní transkripcí) vyhodnotit původní množství miRNA ve vzorku. Pro tento typ detekce, stejně jako i pro další níže zmíněné metody, již existují komerčně

dostupné sady. Detekci miRNA na principu RT-PCR lze provádět například produkty „miScript miRNA PCR Array“ nebo „miRCURY LNA miRNA PCR Assay“ firmy Qiagen, která poskytuje i bezplatný software pro zpracování dat. Obdobnou variantu nabízí také firma ThermoFisher Scientific, která pod komerčním označením „TaqMan™ MicroRNA Assays“ nabízí sady roztoků na reverzní transkripci, PCR a fluorescenčně značené primery pro konkrétní miRNA. Další volbou může být sada produktů „Luna® Universal“ firmy New England Biolabs. Metoda stanovení miRNA pomocí RT-PCR je běžně využívána, avšak vyžaduje nadstandardní vybavení, jakým je LightCycler, tedy přístroj měřící intenzitu fluorescence v průběhu amplifikace.

Jiným postupem detekce miRNA, často využívaným *in situ*, je metoda založená na hybridizaci cílové molekuly a následné detekci pomocí fluorescenčně (fluorescent *in situ* hybridization – FISH) či radiologicky značených sond. Využití techniky v histologických či biopsických preparátech umožňuje sledovat expresi dané miRNA s důrazem na lokalizaci v buňce či tkáni. Při použití tohoto principu *in vitro* se využívá i přenos separované celkové RNA vzorku z gelu na membránu (Northern blotting) a následná detekce miRNA autoradiograficky pomocí fotografického papíru nebo moderněji kamerou s vysokým rozlišením. Modifikovanou verzi této metody nabízí např. firma Invitrogen pod označením „mirVana™ miRNA Detection Kit“.

Alternativou hybridizační metody jsou tzv. microarrays, do češtiny překládané jako „čipy“. Sonda je v tomto případě imobilizovaná na povrchu čipu a hybridizuje s komplementární miRNA z analyzovaného vzorku, která je před nanesením na čip fluorescenčně značena. Výhodou tohoto uspořádání je značná miniaturizace. Zařazení mezi tzv. vysokokapacitní metody, tedy umožnění analýzy většího počtu vzorků najednou, ji činí vhodnou i pro klinické účely. Nevýhodou je však nutnost pořízení vysokorozlišovací kamery, drahých fluorescenčních značek a taky větší náchylnost k chybám [26].

Nejnovější přístupy využívají moderní technologie, jako např. sekvenování

Tab. 1. Porovnání standardních a nově vyvíjených technologií pro detekci mikroRNA.

	Název metody	Výhody	Nevýhody
Standardní technologie	Northern blotting	nízká cena, komplexita vzorku	nižší specifita, pracnost, radioaktivní značení
	RT-PCR	robustnost, senzitivita	drahé vybavení, drahé fluorescenční sondy
	FISH	detekce <i>in situ</i>	kvantifikace pouze vysoce školeným personálem
	microarrays	vysokokapacitní metoda	náročné zpracování dat
	NGS	vysokokapacitní metoda	drahé, nevhodné pro kvantifikaci, chybovost
Nově vyvíjené technologie	izotermální amplifikace	rychlá exponenciální amplifikace, jednoduché vybavení	náchylnost ke kontaminaci
	hybridizační řetězová reakce	jednoduchost, zvýšená specifita	pouze lineární amplifikace, náročnější design DNA sond
	nanobiosenzory	vysoká citlivost, miniaturizovatelné	dražší, nižší reprodukovatelnost
	elektrochemické biosenzory	levné, rychlé, miniaturizovatelné	nespecifické adsorpce na elektrody, nižší stabilita
	Nanopore	detekce jedné molekuly, bez značení	nepřesnost

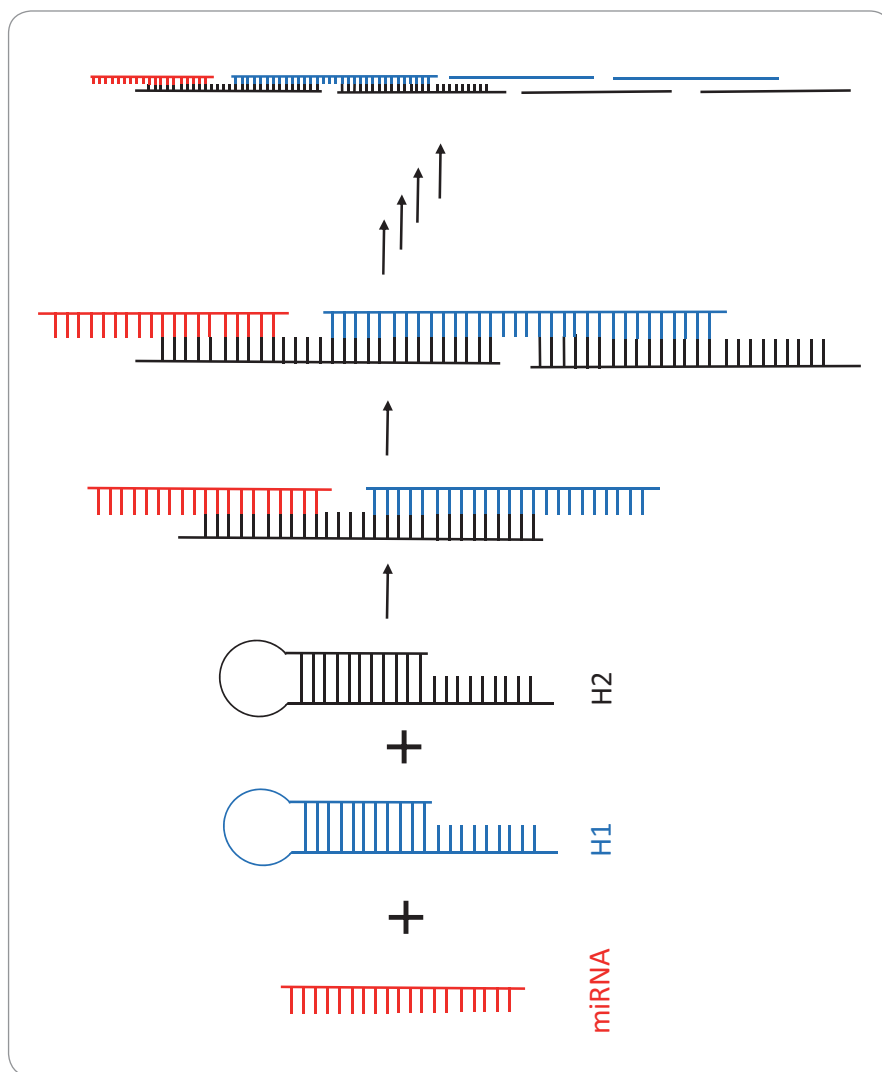
RT-PCR – polymerázová řetězová reakce, FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace, NGS – sekvenování nové generace

vání nové generace (next generation sequencing – NGS) [27]. Hlavní nevýhodou této metody při aplikaci do klinické praxe je jistě její finanční náročnost. Při vyšším počtu vzorků charakterizovaných při jedné analýze by sice klesla cena, avšak toto s sebou nutně přináší pokles kvality samotné analýzy. Metoda, ačkoliv je finančně i časově náročná, pomohla objevit sekvence mnoha dříve nepublikovaných miRNA [28]. Sadu reagentů nabízí například firma New England Biolabs (NEBNext™) pro spojení se sekvenátory značky Illumina.

Technologicky nejnáročnější a komerčně nejnověji dostupnou metodu na principu hybridizace nabízí firma NanoString pod označením „nCount

ter“ miRNA Assays“. Výrobce udává vysokou citlivost detekce, a to až jednu stanovovanou molekulu na buňku. Vysoká specifita je zaručena dvěma sondami, z nichž jedna nese kombinaci fluorescenčních značek emitující specifický signál v podobě čárového kódu, což dává možnost paralelního stanovení více různých miRNA sekvencí v jednom vzorku. Komplex miRNA a sond je adsorbován na povrch, který je poté snímán kamerou s vysokým rozlišením (obr. 2). Výraznou nevýhodou je ovšem nutnost pořízení dražší instrumentace (podobně jako v případě sekvenování).

Vzhledem k tomu, že jedna miRNA dokáže regulovat desítky genů, je někdy obtížné správně interpretovat změněné



Obr. 3. Princip hybridizační řetězové reakce.

Po přidání dvou vlásenkových DNA sond (H1 – modrá a H2 – černá) do vzorku s cílovou miRNA (červená) dochází k otevření vlásenkových struktur a k řetězové hybridizaci mezi H1 a H2.

hladiny miRNA. Lze rovněž pozorovat značnou nekonzistentnost v publikovaných studiích o hladinách miRNA u různých patologických stavů, a proto je často obtížné vybrat jednoznačně průkazný biomarker predikce onemocnění, jeho progresu či odpovědi na léčbu. Značná variabilita může být rovněž dána použitou metodou analýzy či subjektivní chybou při vyhodnocování dat a vylučováním odlehklých hodnot. Úspěšným příkladem je patentovaný diagnostický test pro detekci hladin miR-31-5p, miR-93-5p a miR-191-5p v močovém supernatantu, kterým lze odlišit pacienty s karcinomem močového měchýře od zdravých jedinců [30].

Současné trendy

Každá z výše zmíněných metod, běžně používaných ve výzkumu miRNA, má pochopitelně kromě svých pozitiv i určitá negativa. I proto jsou neustále vyvíjeny nové technologie a metodologie, které se snaží překonat tyto limitace, příp. snížit celkové náklady analýzy. Je potřeba si však uvědomit, že se jedná o nesourodou skupinu různých strategií a přístupů, a to jednak z pohledu detekční metody (která je nejčastěji fluorescenční, chemiluminiscenční, kolorimetrická nebo elektrochemická), tak i způsobu přípravy vzorku, typu sondy nebo strategie pro zvýšení citlivosti. Každá detekční metoda má své výhody

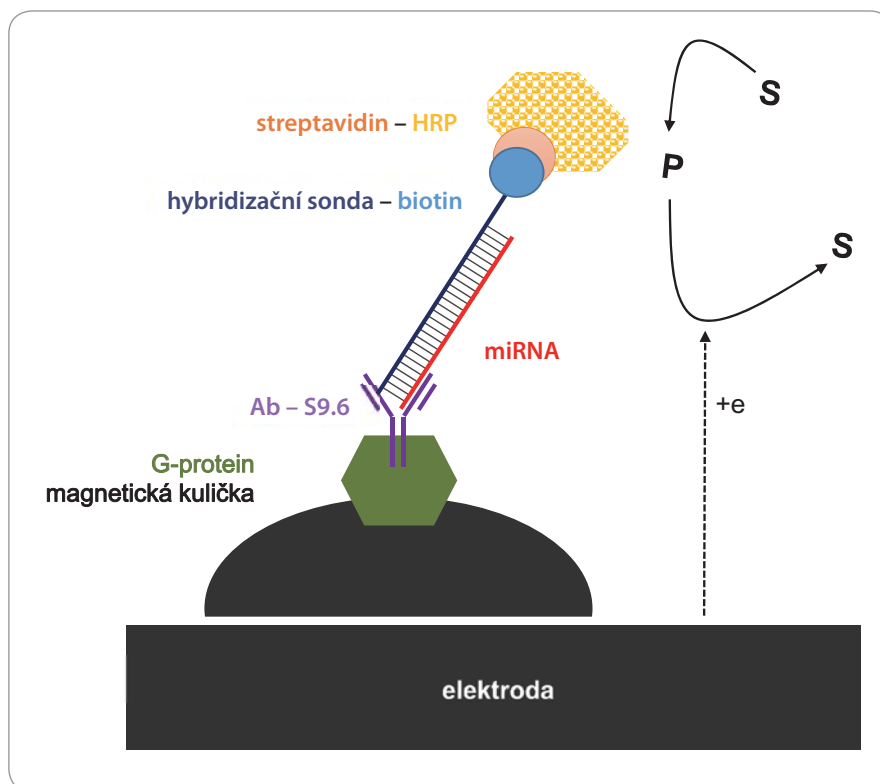
i nevýhody (tab. 1) a podrobněji jsou rozepsány v jiných přehledových článcích [24,26,31,32]. Mezi nejčastěji publikované přístupy patří tzv. elektrochemické biosenzory, u nichž hybridizace miRNA s vhodnou sondou, značení i samotné měření probíhá na povrchu elektrody. Elektrochemické metody totiž skýtají výhody ve formě levnější instrumentace, rychlého měření, možnosti miniaturizace nebo paralelní detekce vzorků, a jsou proto čím dál častěji používány pro detekci nejenom miRNA, ale i dalších nukleových kyselin [31,33–36]. Na druhé straně mnoho publikovaných přístupů (a to nejenom elektrochemických) nebylo doposud validováno na klinickém materiálu, či dokonce ani na buněčných liniích, takže je těžké určit jejich eventuální aplikovatelnost do praxe. Proto zde uvádíme jen ty práce, u kterých byla demonstrována klinická využitelnost, a mají tak jistý potenciál uspět.

Začneme u způsobu přípravy vzorků, který nejčastěji obnáší pre-amplifikaci dané miRNA, a to buď pomocí RT-PCR (popsanou výše), anebo tzv. izotermální amplifikace (IA). V porovnání s PCR jsou techniky IA obvykle rychlejší (často stačí < 1 hod) a instrumentálně méně náročné (nevyžadují termální cykler, protože reakce probíhá při konstantní teplotě). Existuje spousta typů IA, ovšem pro detekci miRNA je nejčastěji využívána amplifikace otáčivou kružnicí (rolling circle amplification – RCA), případně amplifikace zprostředkovaná smyčkou (loop-mediated isothermal amplification – LAMP) [37]. Jako příklad lze uvést bioluminescenční metodu využívající miRNA jako primer pro RCA reakci a luciferázu pro detekci pyrofosfátu uvolňovaného během amplifikace [38]. RCA byla použita i v práci Li et al [39], kde autoři detekovali tumor supresorovou miR-486-5p u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic, a to pomocí speciální vlásenkové sondy, která po hybridizaci s miRNA a následné změně konformace sloužila jako primer pro DNA polymerázu. Zajímavou alternativou pre-amplifikace, která nespadá mezi techniky IA, je tzv. hybridizační řetězová reakce (hybridization chain reaction – HCR) nevyžadující polymerázu ani jiné enzymy (obr. 3). miRNA slouží v reakci pouze jako

iniciátor katalyzující otevření a následnou řetězovou hybridizaci dvou k sobě komplementárních DNA vlásenek, čímž dochází k vytvoření dlouhé DNA struktury složené z množství krátkých sekvencí [40]. Na rozdíl od technik IA a PCR, které vykazují exponenciální amplifikaci, HCR amplifikuje pouze lineárně, a je tudíž méně citlivá. Zajímavou strategií, kombinaci HCR a zlatých nanočástic představili Miao et al [41]. V přítomnosti miR-21 a dvou vlásenek došlo k vytvoření dlouhého polymeru DNA nesoucího výrazný záporný náboj a následně k elektrostatické vazbě kladně nabitých nanočástic způsobujících jejich agregaci. Výsledné agregáty byly detekovány kolorimetricky volným okem, což výrazně zjednodušovalo celý protokol.

Nejčastějším typem sondy, a to nejenom u standardních metod detekce, ale i u nových přístupů, jsou krátké DNA oligonukleotidy, komplementární k hledané miRNA sekvenci. Pro zvýšení afinity k DNA nebo RNA však může být použit speciální syntetický analog nukleových kyselin, např. LNA (locked nucleic acid), obsahující methylenovou skupinu kovalentně spojující 2'-kyslík a 4'-uhlík na ribóze. Jelikož se jedná o modifikaci cukerného zbytku a nikoliv bází, klasické párování zůstává zachováno. LNA-RNA nebo LNA-DNA duplexy vykazují vyšší stabilitu díky zvýšené teplotě tání, lepší odolnost vůči nukleázám a rovněž jednodušší rozlišení nekomplementárních úseků. LNA modifikace najdeme v již zmíněném kitu „miRCURY LNA miRNA PCR Systém“ firmy Qiagen, příp. v metodách založených na *in situ* hybridizaci pro přímou detekci miRNA v buňkách [26].

Pre-amplifikace miRNA je sice krokem zvyšujícím citlivost metody, je ovšem časově náročná a náchylná na amplifikaci nesespecifických sekvencí. Většina nově vyvíjených metod se snaží tento krok obejít a pokouší se zvýšit citlivost samotného měření (tj. amplifikovat signál) použitím různých sofistikovaných strategií. Pro tyto účely jsou velmi populárním nástrojem nanomateriály [31,36,42,43], sloužící nejenom jako značky pro samotnou detekci (např. kvantové tečky nebo zlaté nanočástice, vykazující dobré optické nebo elektrické vlastnosti), ale



**Obr. 4. Elektrochemický přístup kombinující magnetické kuličky s G-proteinem, speciální protilátkou (Ab S9.6) vázající duplex miRNA a DNA sondy, a detekci enzymatické reakce na uhlíkové elektrodě. Modifikované magnetické kuličky byly k elektrodě přitáhnuty magnetem. Jako substrát byla použita dvojice HQ/peroxid vodíku. Křénová peroxidáza oxidovala HQ na benzochinon, který byl zpětně redukován na elektrodě. HRP – horseradish peroxidase, HQ – hydrochinon
Upraveno podle [51], se souhlasem American Chemical Society.**

i jako vhodná platforma pro imobilizaci velkého množství sond (nanočástice, grafén, uhlíkové nanotrubičky) díky jejich velké specifické ploše (tj. poměru velikosti plochy k objemu). Nedávno Su et al připravili zlaté nanostruktury s obrovskou specifickou plochou, které modifikovali DNA sondami pro následnou hybridizaci a detekci miR-21 v plicních nádorových buňkách A549 [44]. I když jsou nanomateriály slibným nástrojem v detekci miRNA, jsou stále relativně drahé a příliš málo používány při analýze klinického materiálu.

Další možností zvýšení citlivosti je použití tzv. duplex-specifické nukleázy (DSN). Jedná se o speciální enzym štěpící pouze dvoušroubovicovou DNA nebo DNA v rámci hybridních duplexů DNA-RNA, nikoliv však samotnou jednovláčkovou DNA. Vazbou miRNA na komplementární DNA sondu a následným přidáním DSN dochází k rozštěpení

sondy a uvolnění miRNA, která je poté detekována různými způsoby [45]. Kolorimetrické stanovení není v tom případě vždy dostatečně senzitivní, citlivost se však dá zvýšit pomocí zlatých nanočástic [46]. Elektrochemické přístupy obvykle umožňují tímto postupem stanovit pouze jednu sekvenci miRNA [47], nejlepší se proto jeví aplikace multiplexové fluorescenční detekce za použití více fluoroforů připojených na jednotlivé DNA sondy [48]. I další proteiny specificky interagující s miRNA mohou pomoci při její detekci. Jedním z nich je virový protein p19 vázající krátké RNA-RNA duplexy. Torrente-Rodríguez et al vyvinuli elektrochemickou metodu pro stanovení miR-21 a miR-205 v buněčných liniích i prsních nádorech [49,50]. Postup ovšem vyžadoval použití dražších RNA sond, které byly po hybridizaci s miRNA izolovány pomocí magnetických kuliček modifikovaných proteinem

p19. Později nahradili protein p19 speciální protilátkou S9.6, která váže krátké DNA-RNA duplexy, a mohly tak být použity levnější DNA sondy (obr. 4) [51].

Inovativní přístup detekce miRNA představuje tzv. NANOPORE technologie, v současnosti poskytována společností Oxford Nanopore Technologies. Je založena na měření změn elektrické vodivosti během transportu DNA nebo RNA přes protein α -hemolysin, tvořící cca 2nm pór v lipidické membráně. Pro tyto účely byly vyvinuty speciálně značené DNA sondy, které po vytvoření duplexu s cílovou miRNA a následném přestupu přes pór dočasně snížily vodivost uvnitř póru. Původní článek, publikovaný v Nature Nanotechnology [52], demonstroval úspěšnou detekci miR-155 v plazmě pacientů s rakovinou plic, kde tato miRNA vykazuje zvýšenou hladinu.

Závěr

Objevení souvislosti mezi hladinami miRNA a patogenezí nádorových či jiných onemocnění mělo za následek masivní rozvoj detekčních metod pro jejich detekci. K standardním metodám, jakými jsou RT-PCR, microarrays nebo NGS, postupně přibývají méně tradiční přístupy cílící zejména na snížení nákladů, urychlení měření nebo zjednodušení postupu. Tyto přístupy však čelí řadě výzev. Zřejmě největší z nich je aplikace vyvíjené metody na klinickém materiálu, která ve většině případů nebyla doposud demonstrována. Častým nedostatkem je i slabá validace pomocí standardních metod, velmi nízký počet detekovaných sekvencí (obvykle jenom jedna, přičemž vhodnější by bylo použití panelu miRNA), nízká reprodukovatelnost nebo neschopnost rozlišit vysoce homologní miRNA z jedné rodiny. Nedávné pokroky v oblasti nanotechnologií, biomateriálů nebo mikrofluidiky by však mohly pomoci překonat tyto překážky k dosažení levné, rychlé a dostatečně citlivé detekce miRNA v klinickém materiálu.

Literatura

- Huang Y, Shen XJ, Zou Q et al. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem* 2011; 67(1): 129–139. doi: 10.1007/s13105-010-0050-6.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843–854.
- miRBase. miRBase: the microRNA database. [online]. Available from: <http://mirbase.org>.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(24): 15524–15529. doi: 10.1073/pnas.242606799.
- Didiano D, Hobert O. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3', UTR. *RNA* 2008; 14(7): 1297–1317. doi: 10.1261/rna.1082708.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281–297.
- Lee H, Han S, Kwon CS et al. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell* 2016; 7(2): 100–113. doi: 10.1007/s13238-015-0212-y.
- Riffo-Campos AL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose? *Int J Mol Sci* 2016; 17(12): pii: E1987. doi: 10.3390/ijms17121987.
- microRNA. Predicted microRNA targets & target downregulation scores. [online]. Available from: <http://34.236.212.39/microna/home.do>.
- TargetScan. Predicted microRNA targets. [online]. Available from: http://www.targetscan.org/vert_72/.
- miRWalk. The miRWalk database. [online]. Available from: <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>.
- miRDB. miRDB target prediction. [online]. Available from: <http://www.mirdb.org/>.
- Slabý O, Svoboda M (ed). MikroRNA v onkologii. 1. vydání. Praha: Galén 2012.
- Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(3): 203–221. doi: 10.1038/nrd.2016.246.
- Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed Rep* 2016; 5(4): 395–402. doi: 10.3892/br.2016.747.
- Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR et al. Modulation of K-ras-dependent lung tumorigenesis by microRNA-21. *Cancer Cell* 2010; 18(3): 282–293. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.013.
- Slabý O (ed). MicroRNAs in solid cancer: from biomarkers to therapeutic targets. New York: Nova Science Publishers 2012.
- Gounaris-Shannon S, Chevassut T. The role of miRNA in haematological malignancy. *Bone Marrow Res* 2013; 2013: 269107. doi: 10.1155/2013/269107.
- Calin GA, Croce CM. Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications. *J Clin Invest* 2007; 117(8): 2059–2066. doi: 10.1172/JCI32577.
- Wiltong SM, van Boerdonk RAA, Henken FE et al. Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. *Mol Cancer* 2010; 9: 167. doi: 10.1186/1476-4598-9-167.
- Slabý O. MikroRNA vstupují do klinického testování. *Klin Onkol* 2012; 25(2): 139–142.
- Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G et al. Therapeutic miRNA and siRNA: moving from bench to clinic as next generation medicine. *Mol Ther Nucl Acids* 2017; 8: 132–143. doi: 10.1016/j.omtn.2017.06.005.
- Kamanu TK, Radovanovic A, Archer JA et al. Exploration of miRNA families for hypotheses generation. *Sci Rep* 2013; 3: 2940. doi: 10.1038/srep02940.
- Graybill RM, Bailey RC. Emerging biosensing approaches for microRNA analysis. *Anal Chem* 2016; 88(1): 431–450. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04679.
- Aryani A, Denecke B. In vitro application of ribonucleases: comparison of the effects on mRNA and miRNA stability. *BMC Res Notes* 2015; 8: 164. doi: 10.1186/s13104-015-1114-z.
- de Planell-Saguer M, Rodicio MC. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin Biochem* 2013; 46(10–11): 869–878. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.02.017.
- Hu Y, Lan W, Miller D. Next-generation sequencing for microRNA expression profile. *Meth Mol Biol* 2017; 1617: 169–177. doi: 10.1007/978-1-4939-7046-9_12.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011; 39 (Suppl 1): D152–D157. doi: 10.1093/nar/gkq1027.
- Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008; 26(3): 317–325. doi: 10.1038/nbt1385.
- Juracek J, Peltanova B, Dolezel J et al. Genome-wide identification of urinary cell-free microRNAs for non-invasive detection of bladder cancer. *J Cell Mol Med* 2018; 22(3): 2033–2038. doi: 10.1111/jcmm.13487.
- Kilic T, Erdem A, Ozsoz M et al. microRNA biosensors: opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques. *Biosens Bioelectron* 2018; 99: 525–546. doi: 10.1016/j.bios.2017.08.007.
- Tian T, Wang J, Zhou X. A review: microRNA detection methods. *Org Biomol Chem* 2015; 13(8): 2226–2238. doi: 10.1039/c4ob02104e.
- Bartošik M, Hrstka R. Bioelectrochemistry of nucleic acids for early cancer diagnostics – analysis of DNA methylation and detection of microRNAs. *Rev Anal Chem* 2017; 36(1): 20160022. doi: 10.1515/revac-2016-0022.
- Bartošik M, Paleček E, Vojtěšek B. Elektrochemická analýza nukleových kyselin, bílkovin a polysacharidů v biomedicině. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): 53–60. doi: 10.14735/amko20141553.
- Paleček E, Bartošik M. Electrochemistry of nucleic acids. *Chem Rev* 2012; 112(6): 3427–3481. doi: 10.1021/cr200303p.
- Ciui B, Jambrec D, Sandulescu R et al. Bioelectrochemistry for miRNA detection. *Curr Opin Electrochem* 2017; 5(1): 183–192. doi: 10.1016/j.coelec.2017.09.014.
- Deng R, Zhang K, Li J. Isothermal amplification for microRNA detection: from the test tube to the cell. *Acc Chem Res* 2017; 50(4): 1059–1068. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00040.
- Sun Y, Gregory KJ, Chen NG et al. Rapid and direct microRNA quantification by an enzymatic luminescence assay. *Anal Biochem* 2012; 429(1): 11–17. doi: 10.1016/j.ab.2012.06.021.
- Li Y, Liang L, Zhang C-y. Isothermally sensitive detection of serum circulating miRNAs for lung cancer diagnosis. *Anal Chem* 2013; 85(23): 11174–11179. doi: 10.1021/ac403462f.
- Bi S, Yue S, Zhang S. Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine. *Chem Soc Rev* 2017; 46(14): 4281–4298. doi: 10.1039/c7cs00055c.
- Miao X, Ning X, Li Z et al. Sensitive detection of miRNA by using hybridization chain reaction coupled with positively charged gold nanoparticles. *Sci Rep* 2016; 6: 32358. doi: 10.1038/srep32358.
- Jamali AA, Pourhassan-Moghaddam M, Dolatabadi JE et al. Nanomaterials on the road to microRNA detection with optical and electrochemical nanobiosensors. *TrAC Trends Anal Chem* 2014; 55: 24–42. doi: 10.1016/j.trac.2013.10.008.
- Fiammengro R. Can nanotechnology improve cancer diagnosis through miRNA detection? *Biomark Med* 2017; 11(1): 69–86. doi: 10.2217/bmm-2016-0195.
- Su S, Wu Y, Zhu D et al. On-electrode synthesis of shape-controlled hierarchical flower-like gold nanostructures for efficient interfacial DNA assembly and sensitive electrochemical sensing of microRNA. *Small* 2016; 12(28): 3794–3801. doi: 10.1002/smll.201601066.
- Qiu X, Zhang H, Yu H et al. Duplex-specific nuclease-mediated bioanalysis. *Trends Biotechnol*

- 2015; 33(3): 180–188. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.12.008.
46. Shen W, Deng H, Ren Y et al. A real-time colorimetric assay for label-free detection of microRNAs down to sub-femtomolar levels. *Chem Commun* 2013; 49(43): 4959–4961. doi: 10.1039/c3cc41565a.
47. Ren Y, Deng H, Shen W et al. A highly sensitive and selective electrochemical biosensor for direct detection of microRNAs in serum. *Anal Chem* 2013; 85(9): 4784–4789. doi: 10.1021/ac400583e.
48. Yin BC, Liu YQ, Ye BC. One-step, multiplexed fluorescence detection of microRNAs based on duplex-specific nuclease signal amplification. *J Am Chem Soc* 2012; 134(11): 5064–5067. doi: 10.1021/ja300721s.
49. Torrente-Rodriguez RM, Campuzano S, Lopez-Hernandez E et al. Direct determination of miR-21 in total RNA extracted from breast cancer samples using magnetosensing platforms and the p19 viral protein as detector bioreceptor. *Electroanalysis* 2014; 26(10): 2080–2087. doi: 10.1002/elan.201400317.
50. Torrente-Rodriguez RM, Campuzano S, Lopez-Hernandez E et al. Simultaneous detection of two breast cancer-related miRNAs in tumor tissues using p19-based disposable amperometric magnetobiosensing platforms. *Biosens Bioelectron* 2015; 66: 385–391. doi: 10.1016/j.bios.2014.11.047.
51. Torrente-Rodriguez RM, Ruiz-Valdepenas Montiel V, Campuzano S et al. Fast electrochemical miRNAs determination in cancer cells and tumor tissues with antibody-functionalized magnetic microcarriers. *ACS Sensors* 2016; 1(7): 896–903. doi: 10.1021/acssensors.6b00266.
52. Wang Y, Zheng D, Tan Q et al. Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients. *Nat Nanotechnol* 2011; 6(10): 668–674. doi: 10.1038/nnano.2011.147.

Proteogenomická platforma na identifikáciu nádorovo špecifických antigénov

Proteogenomic Platform for Identification of Tumor Specific Antigens

Faktor J., Hernychová L., Vojtěšek B., Hupp T.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Súhrn

Východiská: Potenciál neoantigénov v indukcii protinádorovej imunitnej odpovede je už desaťročia známy, avšak prvé neoantigénové vakcíny boli vyvinuté len nedávno. Rozvoj genomických a proteomických metód umožnil popis somatických mutácií v nádore a imunogennosť korešpondujúcich neoantigénov môže byť predpovedaná *in silico* prípadne *in vitro*. Kombinácia neoantigénovej vakcinácie so správnym imunologickým postupom umožňuje docieľiť regresiu nádoru. Štúdie neoantigénových vakcín na modelových organizmoch dokazujú vysokú účinnosť postupu a dokonca prvé klinické štúdie zaznamenávajú úspech. **Cieľ:** Cieľom je priblížiť význam neoantigénových vakcín v personalizovanej protinádorovej liečbe a objasniť mechanizmus ich prípravy. Článok popisuje typy mutácií s potenciálom expície imunogénnych neoantigénov nutných pre tvorbu efektívnej vakcíny a približuje aj ostatné procesy nutné k aktivácii T bunkovej protinádorovej odpovede pacienta. Predovšetkým je zameraný na identifikáciu vysokoppravdepodobných neoantigénových sekvencií aplikáciou metód sekvenovania novej generácie a hmotnostnej spektrometrie (mass spectrometry – MS), čo je pre tvorbu vakcíny kľúčové. V článku je popísaný princíp proteogenomickej platformy, ktorá vznikla na našom pracovisku za účelom konfidentnej identifikácie mutančných peptidov v biologickom materiáli. Zmieňuje sa aj o možnosti kvantifikácie neoantigénov MS metódami monitorovania vybraných reakcií (selected reaction monitoring – SRM) a SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra). Potenciál neoantigénovej vakcinácie v protinádorovej terapii dokazujú úspešné klinické štúdie zhrnuté v závere článku.

Kľúčové slová

vakcinácia – hmotnostná spektrometria – neoplazmy – antigény – peptidy

Summary

Background: Although immune responses to “cancer neoantigens” have been known for decades, the first neoantigen vaccines emerged only very recently. Current developments in genomics and proteomics have enabled descriptions of tumor mutational landscapes, and the immunogenicity of corresponding neoantigens can now be predicted either *in silico* or *in vitro*. Cancer regression could be achieved via a combination of neoantigen vaccination and an appropriate immunology approach. Research in model organisms and the results of initial clinical trials of neoantigen vaccines have shown them to be effective. **Purpose:** We aim to emphasize the importance of neoantigen vaccines in personalized cancer treatment and describe their preparation. We summarize mutations leading to expression of an immunogenic antigen necessary for vaccine development. The processes leading to activation of T-cell anticancer immunity in a patient are briefly introduced. We especially focus on the identification of high confidence neoantigens by next-generation sequencing (NGS) and mass spectrometry (MS), which is key element in the process of designing neoantigen vaccines. Briefly, we describe a proteogenomic platform for confident identification of mutant peptides in biological material. We mention the possibility of neoantigen quantification in biological material using mass spectrometry such as SRM (selected reaction monitoring) and SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra). Successful clinical studies demonstrating the potential of neoantigen vaccination in personalized cancer treatment are summarized at the end of the paper.

Key words

vaccination – mass spectrometry – neoplasms – organ-specific neoantigen

Práca bola podporená projektom MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Jakub Faktor

Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: jakub.faktor@mou.cz

Přijato/Accepted: 9. 7. 2018

doi: 10.14735/amko201825102

Úvod

V súčasnosti sa voľba protinádorovej terapie zakladá prevažne na výsledkoch histopatologického vyšetrenia, symptómoch ochorenia a na informáciách o predošlej liečbe pacienta. Dnešné terapeutické postupy sú príliš generalizované a použité liečivá pôsobia nešpecificky, čo vedie k vedľajším účinkom a k nedostatočnej terapeutickému účinnosti. Výsledkom je nízky benefit pacienta z liečby, nízka kvalita života pacienta a pomerne krátka doba prežívania. S príchodom omics metód došlo ku kvalitnejšej charakterizácii nádorov na úrovni genómu, proteómu a metabolómu [1]. Molekulárne-biologická charakterizácia odhalila mnohé nové nádorové markery a terapeutické ciele, ktoré lepšie stratifikujú pacientov a umožňujú cielenie liečby. Detailná charakteristika nádoru pomáha lekárom zvoliť lepší liečebný postup, prípadne aplikovať postup presne „šitý na mieru“. K ďalšiemu rozvoju personalizovaných liečebných postupov by mohla výrazne prispieť kombinácia štandardných terapeutických postupov, molekulárnej diagnostiky a imunoterapie.

Začiatky imunoterapie siahajú až do 19. storočia, keď v roku 1891 americký chirurg W. B. Coley zacielením imunitný systém proti inoperabilnému nádoru (sarkóm) injekciou živej streptokokovej kultúry priamo do nádorového tkaniva [2]. Niekoľko desaťročí neskôr bola na myších modeloch objavená a popísaná protinádorová imunita [3]. Pre lepšie pochopenie nádorovo špecifických imunitných odpovedí bol kľúčový objav dendritických buniek potencujúcich T bunky [4] a charakterizácia hlavného histokompatibilného komplexu (major histocompatibility complex – MHC) molekúl prezentujúcich antigény [5]. Následne bolo dokázané, že myši, ale aj ľudský imunitný systém špecificky reagujú na nádorové antigény pomocou T buniek, ktoré sa radia medzi tumor infiltrujúce lymfocyty (TIL) [6,7]. Ďalším podstatným objavom pre tvorbu efektívnych liečebných postupov šitých na mieru bol objav imunogenicity neoantigénov produkovaných dôsledkom expície génov so somatickou mutáciou alebo transláciou vírusových génov [8]. Využitie vírusových anti-

génov pre imunoterapiu je limitované na nádory vzniknuté vírusovou infekciou. Neoantigény vznikajúce zo somatických mutácií sú výsledkom genetickej nestability a transformácie nádorov. Preto sa predpokladá ich širšie využitie v protinádorovej terapii. Neoantigény sú v súčasnosti pravdepodobne najzaujímavejším cieľom modernej imunoterapie, najmä kvôli tomu, že imunitný systém si voči nim nevytvára toleranciu [9].

Tumor špecifické neoantigény

Imunoterapia cielená na vlastné antigény s charakteristicky zvýšenou expresiou v nádorovom tkanive sa ukazuje ako neefektívna a úspešnosť tohto prístupu je zriedkavá [9,10]. Vlastné antigény sú prítomné aj v zdravom tkanive, majú nízku imunogénnosť a imunitný systém má voči nim zvýšenú toleranciu, zatiaľ čo neoantigény sú nádorovo špecifické a pravdepodobne imunogénne. Najčastejšie vznikajú jednonukleotidovými variáciami (single nucleotide variants – SNV), ktoré vedú k zámene jednej aminokyseliny v sekvencii proteínu. Ich imunogénnosť je zaručená kontaktom mutovanej časti sekvencie s T bunkou. Mutácia sa však môže vyskytnúť aj v mieste ukotvenia na MHC molekulu, čo môže ovplyvniť prezentáciu wild type antigénov [11,12]. SNV sú často jedinečné pre pacienta, no môžu poslúžiť aj na tvorbu terapeutických postupov pre väčšie kohorty pacientov, pokiaľ sa často opakujú.

Inzercie a delécie spôsobujúce posun čítacieho rámca sú ďalším bohatým zdrojom neoantigénov. Posun čítacieho rámca je spôsobený zaradením alebo vymazaním nukleotidu v kódujúcej sekvencii antigénu, pričom transláciou potom vzniká neoantigén s úplne odlišnou sekvenciou v porovnaní s vlastným antigénom. Predpokladá sa vysoká imunogénnosť. Laumont et al vo svojej štúdii dokazujú, že antigény vzniknuté posunom čítacieho rámca alebo transláciou nekódujúcich oblastí sú prezentované molekulami ľudského leukocytového antigénu (human leukocyte antigen – HLA) a môžu vyvolať špecifickú reakciu imunitného systému. Odhaduje sa, že až 10 % peptidov prezentovaných molekulami HLA pochádza

z nekódujúcich oblastí genómu alebo z produktov vzniknutých posunom čítacieho rámca [13]. Alternatívne môžu neoantigény vzniknúť pri translokáciách chromozómov alebo počas peptidového splicingu. Pri translokácii chromozómov dochádza k spojeniu 5' konca génu s 3' koncom iného génu a tak vzniká fúzny proteín. Translokácia chromozómov je charakteristická pre sarkómové ochorenia a zabezpečuje nádorovým bunkám nesmrteľnosť. Ukázalo sa, že časť sekvencie novovzniknutého fúzneho proteínu charakteristického pre synoviálny sarkóm sa viaže na HLA molekuly a indukuje cytotoxické T bunky [14]. Peptidový splicing sa typicky odohráva v proteazóme, pričom dochádza k vyštípeniu segmentu z proteínu a k tvorbe neoantigénu fúziou zvyšných segmentov [15]. Metódami hmotnostnej spektrometrie (mass spectrometry – MS) bol popísaný fúzny peptid zložený z dvoch segmentov sekvencie proteínu SP110 spojených v opačnom poradí. Chromatografickou analýzou eluátu HLA prezentovaných peptidov bolo dokázané, že fúzny peptid je prezentovaný na HLA molekulách a rozpoznávaný CD8+ T bunkami [16].

Identifikácia neoantigénov je komplikovaná a vyžaduje zapojenie MS, kde dochádza k limitácii, pokiaľ nie sú dostupné metódy schopné predpovedať sekvenciu neoantigénu. Výskum imunogénnych ligandov prezentovaných na HLA molekulách vyžaduje kombináciu viacerých analytických techník pre úspešnú identifikáciu a popis ich využiteľnosti pre protinádorovú terapiu.

Identifikácia tumor špecifických neoantigénov

Identifikáciu neoantigénov na genómovej úrovni umožnil rozvoj sekvenovania novej generácie (next generation sequencing – NGS) metód exómového alebo RNA sekvenovania. Úskalia identifikácie neoantigénov metódami NGS spočívajú vo výskyte polymorfizmov, v heterogenite nádoru, v chybách pri sekvenovaní a v analýze dát. Navyše, zostavovanie genómovej sekvencie je komplikované prítomnosťou paralógnych sekvencií, repetíciami, mobilnými elementami (transpozóny), chybami v prepise RNA do cDNA, chybami v refe-

renčnej sekvencii a to môže viesť k identifikácii falošne pozitívnych mutácií v sekvencovanom genóme [17]. NGS metódy prispeli k identifikácii množstva mutácií v rôznych typoch nádorového tkaniva a bolo zistené, že výskyt mutácií v nádorovom tkanive je determinovaný typom nádoru. Všetky identifikované mutácie však nemusia byť prekladané na ribozómoch a nemusia získať podobu neoantigénu. Metódy MS umožňujú výskum na úrovni proteómu a poskytujú priamu informáciu o existencii neoantigénu. Analýza MS dát je však závislá na dostupnosti referenčnej databázy skúmaných proteínov a je temer nemožná bez vedomosti o tom, čo sa vo vzorke hľadá. Práve preto sa kombinácia NGS a MS metód javí ako ideálna. NGS metódy poskytnú referenčnú databázu kandidátnych genómových mutácií a MS metódami sa overí prítomnosť príslušných neoantigénov na proteínovej úrovni.

Výber tumor špecifických neoantigénov vhodných pre protinádorovú terapiu a mechanizmus aktivácie neoantigénovej imunitnej odpovede

Identifikované neoantigény môžu skutočne v bunke vznikajú, no nemusia byť imunogénne, pretože nedochádza k ich prezentácii HLA molekulami a k ich rozpoznavaniu T bunkami. Pravdepodobnosť úspešnej prezentácie neoantigénu závisí od afinity a stability komplexu neoantigén – HLA [11]. Afinita neoantigénu k HLA molekule pacienta môže byť predpovedaná *in silico* a pre tento účel bol v minulosti vyvinutý algoritmus NetMHC [18]. Výsledky *in silico* predikcie môžu byť nepresné a skreslené, pretože sú založené na výpočtových metódach. Tvorba komplexu neoantigén – HLA môže byť otestovaná aj *in vitro*. V súčasnosti sú dostupné *in vitro* testy, ktoré popisujú afinitu a stabilitu komplexu v nanomolárnych koncentráciách a pri fyziologických podmienkach [19]. Testovanie *in silico* a *in vitro* stále nie je zárukou výberu imunogénneho neoantigénu. Neoantigény potencujúce protinádorovú imunitnú odpoveď musia byť spracované dendritickými bunkami *in vivo* a prezentované HLA molekulami na ich

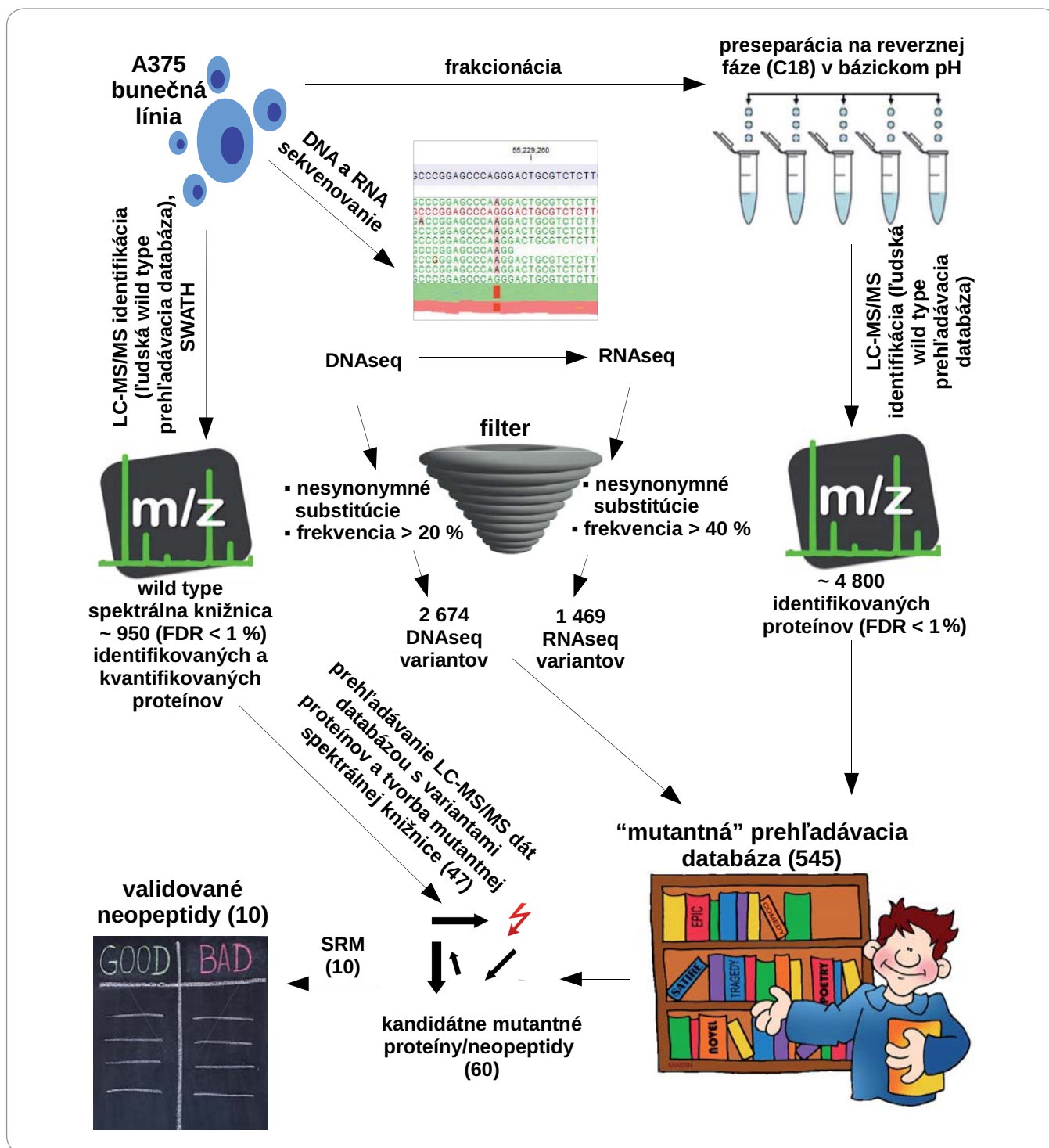
povrchu. Tvorba špecifickej protinádorovej imunitnej odpovede je podmienená kontaktom HLA neoantigénového komplexu na povrchu dendritických buniek s T bunkovým receptorom (T-cell receptor – TCR) na povrchu CD4+ a CD8+ T buniek. Po aktivácii T bunky neoantigénom je sila imunitnej odozvy závislá na kostimulácii sprostredkovej imunostimulačnými cytokínmi (IL-12, IFN- α). Následne, aktivované T bunky musia byť dopravené k tumoru, kde TCR musia špecificky rozoznať HLA neoantigénové komplexy prezentované nádorovými bunkami. Na záver dochádza k lýze rakovinových buniek uvoľnením cytotoxických granulocytov.

Identifikácia a popis HLA prezentovaných neoantigénov potencujúcich imunitný systém pacienta je podstatným krokom k tvorbe efektívnej neoantigénovej vakcíny a k personalizácii liečby. Súčasný rozvoj proteomických metód a metód sekvenovania nukleových kyselín umožnil zacieliť náš výskum na ich identifikáciu vo vzorkách ľudských nádorov.

Proteogenomická platforma na identifikáciu neopeptidov v biologickom materiáli

Proces tvorby neoantigénovej vakcíny potencujúcej protinádorovú imunitnú odpoveď je komplexný a ponúka mnoho možností optimalizácie. Podstatnou časťou tvorby neoantigénovej vakcíny je popis charakteristických mutácií (obr. 1). Genomické metódy nedávajú priamu odpoveď na otázku, či je konečný produkt zodpovedný za aktiváciu T buniek prítomný v nádorovom tkanive. Náš výskum prebiehal na úrovni proteómu, kde sme priamo skúmali prítomnosť a kvantitu efektorovej molekuly – neoantigénu. Proteomická príprava peptidovej vzorky pre MS a MS analýza prebehla podľa publikovaných protokolov [20–22]. V skratke, melanómová buncená línia A375 bola napostovaná do 80% konfluencie a lyzovaná do 8 M močoviny v 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5. Buncené lyzáty A375 boli spracované podľa protokolu štiepenia proteínov na filtri (filter-aided sample preparation – FASP) a odsolené podľa Bouchala et al [20,21]. K detekcii neoantigénov

sme využili základné MS metódy. Identifikácia proteínov prebiehala v dáta dependentnom akvizičnom móde na hmotnostnom spektrometri Triple TOF 5600+ [22]. Problematika MS analýzy neoantigénov spočívala hlavne v nedostupnosti referenčných databáz potrebných na prehľadávanie MS dát. Bežne dostupné referenčné databázy obsahujú sekvencie proteínov vo wild type formách a ich použitie k detekcii mutantných foriem proteínov je limitované. MS metódy sú založené na meraní pomeru hmotnosti k náboju (m/z) a identita mutovaného proteínu nemôže byť z bežnej wild type referenčnej databázy priradená napriek tomu, že mutovaný proteín bol počas MS analýzy detekovaný. Dôvodom je zmena molekulárnej hmotnosti proteínu a zmena fragmentačného spektra, prípadne tvorba nového miesta pre proteolytické štiepenie vplyvom mutácie. K identifikácii mutantných foriem proteínov je nevyhnutná tvorba vlastnej referenčnej databázy s mutantnými sekvenciami proteínov. Genomické metódy NGS poskytujú možnosť *de novo* celogenómového sekvenovania a identifikáciu genetických mutácií na úrovni DNA alebo RNA. Filtráciou založenou na počte readov alebo na abundancii varianty sme získali databázu vysokoppravdepodobných mutácií. Následne bola odvodená referenčná databáza mutantných foriem proteínov preložením genetickej informácie do aminokyselinovej sekvencie. Takto pripravená mutantná referenčná databáza bola potom použitá na prehľadávanie MS dát (obr. 1). Pre každý mutantný proteín/peptid je k dispozícii štatistika vyjadrujúca pravdepodobnosť, s ktorou bol identifikovaný. Mutantné proteíny/peptidy identifikované s vysokou konfidenčiou pravdepodobne vznikajú v mutovanej forme, no napriek tomu môže dochádzať aj k nesprávnemu priradeniu fragmentačného (MS/MS) spektra k sekvencii mutovaného proteínu. Výsledky MS analýzy vyžadujú dôkladnú kontrolu a validáciu. Kontrola pokrytia mutantnej pozície ako aj kontrola fragmentačného spektra neoantigénu vylúči možnosť identifikácie wild type peptidu. MS metódy nemusia zaznamenať podstatné nízkoabundantné peptidy



Obr. 1. Proteogenomická platforma na identifikáciu, kvantifikáciu a validáciu mutantných proteínov/neopeptidov.

Obrázok zobrazuje možnosti identifikácie a kvantifikácie mutantných aminokyselinových sekvencií za pomoci kombinácie genomických a proteomických metód. Kľúčové je využitie genomických metód poskytujúcich Databázu pravdepodobných mutácií, ktorá je následne pretransformovaná do vlastnej prehľadavej knižnice. Prehľadávaním LC-MS/MS dát s vlastnou „mutantnou“ knižnicou sme schopní identifikovať mutantné proteíny/neopeptidy. Pokiaľ je predmetom výskumu kvantifikácia väčšieho množstva mutantných proteínov/neopeptidov možno použiť metódu SWATH spojenú s tvorbou mutantnej spektrálnej knižnice z LC-MS/MS dát. Validáciu, prípadne presnú kvantifikáciu kandidátnych neoantigénov docielime použitím izotopovo značených variantov neopeptidov a metódy monitorovania vybraných reakcií (SRM).

LC-MS/MS – kvapalinová chromatografia spojená s tandemovou hmotnostnou spektrometriou, SWATH – sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra, SRM – selected reaction monitoring, FDR – false-discovery rate

pod detekčným limitom metódy. Efektívitu procesu identifikácie neoantigénov sme zvýšili znížením komplexity vzorky preseparáciou. Dôležitým faktorom bola ortogonalita preseparačnej metódy na separačnú metódu v druhom chromatografickom rozmere [23]. Efektívna dvojdimenzionálna chromatografická metóda (dvojrzmerná kapalinová chromatografia (2D LC)) využíva odlišné mechanizmy separácie v prvom a druhom chromatografickom rozmere. Dobrým príkladom je náš systém s preseparáciou v bázičkej reverznej fáze nasledovanej separáciou v kyslej reverznej fáze. Aplikáciou dvojrozmernej kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (2D LC-MS/MS) možno mnohonásobne zvýšiť počet identifikácií a zvýšiť pokrytie v mutovanej časti sekvencie. Možnosti optimalizácie procesu LC-MS identifikácie neoantigénov spočívajú aj v použití chipových chromatografických kolón vynikajúcich nižším protitlakom, lepšou separáciou a reprodukcibilitou oproti klasickým kapilárnym kolónam. Optimálnou 2D LC-MS/MS metódou sme identifikovali až desiatky neoantigénov.

Cielená proteomika ponúka možnosť validácie LC-MS/MS dát. Metódu SRM (selected reaction monitoring) sme zacieliili na konkrétne vybrané kandidátne neoantigény. Informácie potrebné pre tvorbu SRM metódy sme získali z MS/MS dát príslušných neoantigénov. Výsledné SRM dáta boli spracované podľa dobre definovaných pravidiel implementovaných v softvéri Skyline [24]. Dôveryhodnosť SRM validácie neoantigénov sme zvýšili použitím príslušných ťažkých foriem neoantigénov s izotopovým značením, ktoré slúžia ako referenčné peptidy. Referenčné izotopovo značené peptidy sme museli dôkladne navrhnuť. Izotopovo značená aminokyselina by mala byť v takej pozícii, aby sa spolu so zamenenými aminokyselinami vyskytovala v čo najväčšom počte fragmentových iónov. Fragmentačné spektrá referenčných peptidov sa musia dokonale podobať spektrám neoantigénov a retenčný čas oboch foriem musí byť identický. Úspešne validovaný neoantigén sa potom dá považovať za exprimovaný na proteínovej úrovni [25]. V prípade, že je

predmetom záujmu kvantita neoantigénu, metóda SRM ponúka možnosť absolútnej kvantifikácie. Relatívna kvantifikácia metódou SWATH (sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion spectra) je výnimočná svojou robustnosťou a schopnosťou kvantifikovať všetky detekovateľné proteíny v jednom chromatografickom behu [26]. Do budúca sa dá predpokladať aplikácia metódy SWATH pre robustnú kvantifikáciu viacerých mutančných foriem peptidov alebo neoantigénov v rôznych typoch vzoriek za rôznych podmienok. Pre úspešnú kvantifikáciu bude kľúčové vytvorenie spektrálnej knižnice obsahujúcej MS/MS spektrá mutančných proteínov (obr. 1). Po úspešnej identifikácii a validácii neoantigénov je potrebné pokračovať výberom peptidov, ktoré sú prezentované imunitným systémom a sú imunogénne. Z počítačového listu tisícov variantov identifikovaných metódami NGS sa dostávame k stovkám alebo desiatkam neoantigénov, ktoré sú skutočne exprimované na proteínovej úrovni. Následnou dôkladnou validáciou *in silico*, *in vitro* a *in vivo* sa okruh kandidátov zúži ešte viac, až sa dostávame k listu niekoľkých kandidátov vhodných pre tvorbu protinádorovej vakcíny. Identifikácia neoantigénov použiteľných pre tvorbu protinádorových vakcín je multidisciplinárna záležitosť vyžadujúca kolektív vedcov so znalosťami z medicíny, imunológie, molekulárnej biológie, biochémie a analytickej chémie. Napriek zložitosti problematiky vzniklo niekoľko publikácií, kde sa autorom aspoň čiastočne podarilo využiť vlastné neoantigény pacienta k remisii nádorového ochorenia (vid' nižšie).

Úspešné aplikácie neoantigénových vakcín v protinádorovej terapii

Ott et al pripravili personalizované neoantigénové nádorovo-špecifické vakcíny pre pacientov s melanómom [27]. Pre vakcináciu bolo vybraných 20 neoepitopov na základe DNA a RNA sekvencovania a modelovania afinity k HLA molekulám. Vakcíny boli aplikované subkutánne. U pacientov bola detekovaná indukcia CD4+ a CD8+ T bunkovej odpovede, pričom T bunky špecificky

rozlišovali nádorové neoantigény od wild type antigénov. U 4 zo 6 pacientov došlo k remisii ochorenia počas 25 mesiacov od vakcinácie. Dvaja pacienti s relapsom ochorenia boli dodatočne liečení anti-PD1 biologickou liečbou, ktorá viedla k expanzii neoepitop-špecifických buniek a ku kompletnej remisii ochorenia. Sahin et al použili k protinádorovej vakcinácii molekuly RNA kódujúce neoantigény, ktoré zároveň slúžili ako adjuvans a potencovali imunitnú reakciu [28]. Molekuly RNA kódovali 27-aminokyselinové sekvencie obsahujúce neoepitopy s vysokou pravdepodobnosťou väzby na molekuly MHC I. a II. triedy. Vakcinácia pacientov s pokročilým melanómom viedla ku špecifickej imunitnej reakcii cielenej proti neoepitopom vybraných neoantigénov. V resektáte metastatického melanómového tkaniva bola objavená T bunková infiltrácia spojená s neoepitop-špecifickou elimináciou nádorových buniek. U 2 z 5 pacientov došlo k remisii metastatického melanómu. Jeden z pacientov relaboval po tom, čo došlo k úniku nádoru spod kontroly imunitného systému. Dodatočnou administráciou liečby inhibítormi imunitných kontrolných bodov bol efekt protinádorovej vakcinácie obnovený a zosilnený.

Komentované klinické štúdie dokazujú účinnosť neoantigénovej vakcinácie v praxi. K širšiemu popisu úspešnosti a efektivity neoantigénovej vakcinácie v protinádorovej terapii bude však nutné rozšíriť skupinu pacientov a pokúsiť sa aplikovať vakcináciu na rôzne typy nádorov. Súčasné poznatky naznačujú, že neoantigénovú vakcináciu je vhodné kombinovať s komplementárnymi liečebnými postupmi. Ako úspešná sa javí kombinácia s inhibítormi imunitných kontrolných bodov. K tvorbe neoantigénových protinádorových vakcín je potrebné doriešiť komplikácie s identifikáciou imunogénnych neoepitopov, aktiváciou T bunkovej odpovede v mieste tumoru a s adaptáciou tumoru na imunitnú reakciu. Problematiká môže byť aj postupná strata HLA molekúl na povrchu nádorovej bunky, tvorba fyzickej bariéry, sekrécia imunosupresívnych molekúl, prípadne rekruitácia buniek zodpovedných za

utlmenie imunitnej reakcie. Navyše, podľa matematických modelov, sa vplyvom neoantigénovej vakcinácie predpokladá postupná selekcia subpopulácie nádorových buniek bez prezentácie neoantigénu HLA molekulami.

Záver

Neoantigénová vakcinácia má potenciál zmeniť súčasné prístupy k liečbe nádorových ochorení a individualizovať protinádorovú liečbu. Budúcnosť tohto postupu bude závisieť od automatizácie procesu získavania imunogénnych neoepitopov pacienta a od úspešnosti získavania kontroly nad procesmi vedúcimi k protinádorovej imunite. Podstatné bude aj načasovanie a voľba správneho režimu prídavnej liečby.

Literatúra

- Vucic EA, Thu KL, Robison K et al. Translating cancer 'omics' to improved outcomes. *Genome Res* 2012; 22(2): 188–195. doi: 10.1101/gr.124354.111.
- McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006; 26: 154–158.
- Klein G, Sjorgen HO, Klein E et al. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 1960; 20: 1561–1572.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137(5): 1142–1162.
- Klein J. Seeds of time: fifty years ago Peter A. Gorer discovered the H-2 complex. *Immunogenetics* 1986; 24(6): 331–338.
- Bevan MJ, Cohn M. Cytotoxic effects of antigen- and mitogen-induced T cells on various targets. *J Immunol* 1975; 114(2 Pt 1): 559–565.
- Knuth A, Danowski B, Oettgen HF et al. T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(11): 3511–3515.
- Wölfel T, Van Pel A, De Plaen E et al. Immunogenic (tum-) variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. VIII. Detection of stable transfectants expressing a tum- antigen with a cytolytic T cell stimulation assay. *Immunogenetics* 1987; 26(3): 1780–1787.
- Wirth TC, Kühnel F. Neoantigen targeting-dawn of a new era in cancer immunotherapy? *Front Immunol* 2017; 8: 1848. doi: 10.3389/fimmu.2017.01848.
- Jäger T, Jäger E, Knuth A. Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54(9): 669–674.
- Garstka MA, Fish A, Celie PH et al. The first step of peptide selection in antigen presentation by MHC class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(5): 1505–1510. doi: 10.1073/pnas.1416543112.
- Dubey P, Hendrickson RC, Meredith SC et al. The immunodominant antigen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68. *J Exp Med* 1997; 185(4): 695–705.
- Laumont CM, Perreault C. Exploiting non-canonical translation to identify new targets for T cell-based cancer immunotherapy. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75(4): 607–621. doi: 10.1007/s00018-017-2628-4.
- Worley BS, van den Broeke LT, Goletz TJ et al. Antigenicity of fusion proteins from sarcoma-associated chromosomal translocations. *Cancer Res* 2001; 61(18): 6868–6875.
- Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J et al. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 2004; 304(5670): 587–590. doi: 10.1126/science.1095522.
- Warren EH, Vigneron NJ, Gavin MA et al. An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order. *Science* 2006; 313(5792): 1444–1447. doi: 10.1126/science.1130660.
- Kumar S, Banks TW, Cloutier S. SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. *Int J Plant Genomics* 2012; 2012: 831460. doi: 10.1155/2012/831460.
- Hoof I, Peters B, Sidney J et al. NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics* 2009; 61(1): 1–13. doi: 10.1007/s00251-008-0341-z.
- Harndahl M, Justesen S, Lamberth Ket al. Peptide binding to HLA class I molecules: homogenous, high-throughput screening, and affinity assays. *J Biomol Screen* 2009; 14(2): 173–180. doi: 10.1177/1087057108329453.
- Wisniewski JR, Ostasiewicz P, Mann M. High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. *J Proteome Res* 2011; 10(7): 3040–3049. doi: 10.1021/pr200019m.
- Bouchal P, Roumeliotis T, Hrstka R et al. Biomarker discovery in low-grade breast cancer using isobaric stable isotope tags and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (iTRAQ-2DLC-MS/MS) based quantitative proteomic analysis. *J Proteome Res* 2009; 8(1): 362–373. doi: 10.1021/pr800622b.
- Faktor J, Bouchal P. Building mass spectrometry spectral libraries of human cancer cell lines. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 54–58. doi: 10.14735/amko20164554.
- Gilar M, Olivova P, Daly AE, et al. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Anal Chem* 2005; 77(19): 6426–6434. doi: 10.1021/ac050923i.
- Finney GL, Blackler AR, Hoopmann MR et al. Label-free comparative analysis of proteomics mixtures using chromatographic alignment of high-resolution muLC-MS data. *Anal Chem* 2008; 80(4): 961–971. doi: 10.1021/ac701649e.
- Carr SA, Abbatiello SE, Ackermann BL et al. Targeted peptide measurements in biology and medicine: best practices for mass spectrometry-based assay development using a fit-for-purpose approach. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13(3): 907–917. doi: 10.1074/mcp.M113.036095.
- Gillet LC, Navarro P, Tate S et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(6): O111.016717. doi: 10.1074/mcp.O111.016717.
- Ott PA, Hu Z, Keskin DB et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017; 547(7662): 217–221. doi: 10.1038/nature22991.
- Sahin U, Derhovanessian E, Miller M et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017; 547(7662): 222–226. doi: 10.1038/nature23003.

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Časopis České onkologické společnosti a Slovenskej onkologickej spoločnosti
The Journal of the Czech and Slovak Oncological Societies

REDAKČNÍ RADA

Výkonná redakční rada (Brno)

vedoucí redaktor

doc. MUDr. Vuk Fait, CSc.

MUDr. Petr Čoupek
doc. MUDr. Lenka Foretová, Ph.D.
prof. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.

Širší redakční rada

prof. MUDr. Zdeněk Adam, CSc., Brno
doc. MUDr. Igor Andrašina, CSc., Košice
doc. MUDr. Soňa Balogová, Ph.D., Bratislava
MUDr. Otakar Bednařík, Brno
doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D., Praha
prof. MUDr. David Cibula, CSc., Praha
MUDr. Karel Cwiertka, Ph.D., Olomouc
doc. MUDr. Luboš Drgoňa, CSc., Bratislava
doc. MUDr. Ladislav Dušek, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc., Praha
doc. MUDr. David Feltl, Ph.D., Ostrava
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Olomouc
prof. MUDr. Roman Hájek, CSc., Ostrava
MUDr. Jana Halámková, Ph.D., Brno

Čestní členové redakční rady

prof. MUDr. Josef Bilder, CSc., Brno
prof. Sándor Eckhardt, Budapešť
prof. MUDr. Ludovít Jurga, DrSc., Trnava
doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc., Bratislava

výkonný redaktor

doc. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

MUDr. Ivo Kocák, Ph.D.
MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.
MUDr. Jiří Novák

prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., Praha
doc. MUDr. Alexandra Kolenová, Ph.D., Bratislava
Andrea Lancia, MD, Paris
assoc. prof. Jeong Eon Lee, M.D., Ph.D., Seoul
prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc., Brno
prof. MUDr. Michal Mego, DrSc., Bratislava
prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D., Olomouc
prof. MUDr. Beata Mladosičová, CSc., Bratislava
doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D., Praha
prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc., Bratislava
doc. RNDr. Martina Ondrušová, Ph.D., MPH, Bratislava
prof. Yeon Hee Park, M.D., Ph.D., Seoul
prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., Praha
prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D., Brno
doc. MUDr. Luděk Pour, Ph.D., Brno

prof. Jan Klusterský, Brusel
prof. MUDr. Josef Koutecký, DrSc., Praha
prof. RNDr. Jan Kovařík, DrSc., Brno
prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc., Bratislava

prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.
prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.

doc. MUDr. Igor Puzanov, Nashville
prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc., Praha
prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc., Praha
prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D., Hradec Králové
prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc., Brno
prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D., Brno
MUDr. Tomáš Svoboda, Ph.D., Plzeň
MUDr. Tomáš Šálek, Bratislava
prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D., Brno
doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Anna Vašků, CSc., Brno
prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc., dr. h. c., Brno
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc., Brno
doc. MUDr. Mária Wagnerová, CSc., Košice

doc. MUDr. Jozef Mardiak, CSc., Bratislava
prof. MUDr. Zdeněk Mechl, CSc., Brno
MUDr. Jaroslav Němec, CSc., Brno
MUDr. Viliam Ujházy, DrSc., Bratislava

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2018

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně.

Registrační značka MK ČR 5158. ISSN 0862-495X. ISSN pro on-line přístup 1802-5307.

On-line verze je přístupná na adrese www.linkos.cz nebo www.klinickaonkologie.cz.

Časopis Klinická onkologie je uveden na Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR, schváleném Radou pro výzkum a vývoj vlády ČR.

Nakladatel: Ambit Media, a. s., Klicperova 604/8, 150 00 Praha 5-Smíchov, tel./fax: +420 222 352 573/572.

Odpovědná redaktorka: Mgr. Veronika Hrabalová, e-mail: veronika.hrabalova@ambitmedia.cz.

Adresa redakce: Ambit Media, a. s., Media Hall, Bidláky 20, 639 00 Brno.

Grafická úprava: Karel Zlevor. Jazyková korektura: Mgr. Ivana Dachary.

Vychází 6krát ročně. Předplatné na rok 2018 činí 540 Kč (22 eur).

Informace o předplatném a objednávky předplatitelů: www.centram.cz

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá: Pavel Doležal, e-mail: pavel.dolezal@ambitmedia.cz, tel.: +420 602 632 349.

Rukopisy vkládejte do redakčního systému: <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>; případné dotazy směřujte na e-mail klinickaonkologie@mou.cz

Redakce časopisu Klinická onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, e-mail: klinickaonkologie@mou.cz.

Pokyny pro autory naleznete na www.linkos.cz v sekci časopisu nebo na www.klinickaonkologie.cz.

Toto číslo vychází 15. 10. 2018.

