

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny 1. LF UK

Studijní obor: Experimentální chirurgie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Jiří Vachtenheim

Vztah proteinu SIVA a signálních drah Hedgehog/GLI a mTOR ke vzniku a progresi
nemalobuněčného karcinomu plic.

Relationship of protein SIVA and signaling pathways Hedgehog/GLI and mTOR to the origin
and progression of non-small cell lung cancer.

Disertační práce

Školitel:

Prof. MUDr. Robert Lischke, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 5.9.2021

MUDr. Jiří Vachtenheim

Podpis

Identifikační záznam:

VACHTENHEIM, Jiří. *Vztah proteinu SIVA a signálních drah Hedgehog/GLI a mTOR ke vzniku a progresi nemalobuněčného karcinomu plic. [Relationship of protein SIVA and signaling pathways Hedgehog/GLI and mTOR to the origin and progression of non-small cell lung cancer]*. Praha, 2021. Počet stran 84, počet příloh 0. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, III. chirurgická klinika 1. LF UK. Školitel prof. MUDr. Robert Lischke, Ph.D.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1. Úvod.....	8
1.1. Bronchogenní karcinom.....	8
1.1.1 Epidemiologie a rizikové faktory.....	8
1.1.2 Klasifikace bronchogenního karcinomu	9
1.1.3 Molekulární diverzita bronchogenního karcinomu a genetické abnormality jako léčebné cíle.....	10
1.2 Signální dráha Hedgehog	18
1.2.1 Úvod.....	18
1.2.2 Fyziologická funkce signální dráhy Hedgehog.....	18
1.2.3. Význam signální dráhy Hedgehog v karcinogenezi	20
1.2.4 Signální dráha Hedgehog u nemalobuněčného karcinomu plic.....	20
1.2.5 Cílená léčba aktivované dráhy Hedgehog u nemalobuněčného karcinomu plic	21
1.3 Signální dráha mTOR	23
1.3.1 Úvod.....	23
1.3.2 Fyziologická funkce signální dráhy mTOR.....	23
1.3.3 Význam signální dráhy mTOR v karcinogenezi.....	24
1.3.4. Signální dráha mTOR u nemalobuněčného karcinomu plic	24
1.3.5 Cílená léčba aktivované dráhy mTOR u nemalobuněčného karcinomu plic.....	25
1.4 Protein SIVA.....	26
1.4.1 Úvod.....	26
1.4.2 Fyziologická funkce proteinu SIVA	27
1.4.3 Význam proteinu SIVA-1 v karcinogenezi.....	29
1.4.4. Protein SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic	30
2. Hypotézy a cíle práce.....	32
2.1 Vědecké hypotézy	32
2.1.1 Signální dráha Hedgehog a její význam u nemalobuněčného karcinomu plic	32
2.1.2 Protein SIVA-1 a jeho význam u lidského nemalobuněčného karcinomu plic	32
2.2. Cíle práce	32
2.2.1 Cíle výzkumu signální dráhy Hedgehog a její úlohy u nemalobuněčného karcinomu plic	32
2.2.2 Cíle výzkumu proteinu SIVA-1 a jeho úlohy u nemalobuněčného karcinomu plic	33
3. Metodika	34
3.1 Studium signální dráhy Hedgehog.....	34

3.1.1 Buněčné kultury	34
3.1.2 Buněčné linie	34
3.1.3 Western blot	35
3.1.4 Měření buněčné proliferace	35
3.1.5 Detekce apoptózy	35
3.1.6 Metody s promoter-reporter plazmidy	36
3.1.7 Statistické metody	36
3.2 Studium proteinu SIVA-1	37
3.2.1 Soubor pacientů	37
3.2.2 Odebírané vzorky	37
3.2.3 Analytická fáze	38
3.2.4 Real-time PCR	38
4. Výsledky	39
4.1 Studium signální dráhy Hedgehog	39
4.1.1 Expres komponent a vybraných transkripčních cílů signální dráhy Hedgehog v panelu různých typů nádorových buněk.	39
4.1.2 Inhibice buněčné proliferace pomocí GANT61 (inhibitor transkripčního faktoru GLI)	41
4.1.3 Aktivita promóteru reagujícího na aktivitu GLI faktorů	45
4.2 Studium proteinu SIVA-1	47
4.2.1 Demografická a klinicko-patologická charakteristika souboru pacientů	47
4.2.2 Hladiny proteinu Siva-1 v nádorové a normální plicní tkáni stanovené pomocí Western blotu	49
4.2.3 Stanovení hladiny SIVA-1 mRNA v nádorové a normální plicní tkáni pomocí real-time PCR	51
4.2.4 Srovnání hladiny proteinu SIVA-1 v odebraných vzorcích a ve vybraných liniích buněčných kultur nemalobuněčného karcinomu plic	52
4.2.5 Vztah proteinu SIVA-1 a signální dráhy Hedgehog	55
4.2.6 Subcelulární lokalizace proteinu SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic	57
4.2.7 Citlivost buněk nemalobuněčného karcinomu plic s vneseným SIVA-1 proteinem na metabolické a růstové zásahy	59
5. Diskuze	61
6. Závěr	66
7. Souhrn (v českém a anglickém jazyce)	67
7.1 Souhrn	67
7.2 Summary	68
Vlastní publikace (chronologicky)	69
Použitá literatura	71

Abstrakt

Nemalobuněčný karcinom plic patří v celosvětovém měřítku mezi nejčtenější zhoubná onemocnění vůbec. I přes veškerý pokrok v poznání o jeho etiopatogenezi či vývoji cílené protinádorové terapie, základní výzkum v oblasti tohoto onemocnění a jeho efektivnější léčba představuje nadále výzvu. Signální dráha Hedgehog se v případě své nepřiměřené aktivace podílí onkogenním vlivem na rozvoji nemalobuněčného karcinomu plic. P53 je známý tumor supresorový gen fungující jako bariéra proti vzniku nádorů. Tento jeho účinek je dán především transkripční aktivací různých proapoptotických genů, z nichž jeden je gen kódující protein SIVA-1. Nedávno však bylo překvapivě zjištěno, že SIVA-1 má u nemalobuněčného karcinomu plic na myším modelu nádoru naopak proonkogenní funkci. Cílem této práce bylo více objasnit význam signální dráhy Hedgehog a proteinu SIVA-1 u lidského nemalobuněčného karcinomu plic a případně objasnit jejich možný vzájemný vztah při vzniku a progresi nemalobuněčného karcinomu plic u člověka. Na vybraných nádorových buněčných liniích lidského nemalobuněčného karcinomu plic byla ověřena exprese jednotlivých komponent signální dráhy Hedgehog. Ve vzorcích získaných od 39 pacientů operovaných pro nemalobuněčný karcinom plic a ve vybraných buněčných liniích tohoto nádoru byla potvrzena exprese proteinu SIVA-1. Tyto nálezy potvrzují význam jak dráhy Hedgehog, tak proteinu SIVA-1 při vzniku nemalobuněčného karcinomu plic. Za zásadní nález této práce lze považovat zcela nové a originální zjištění, že protein SIVA-1 aktivuje proonkogenní signální dráhu Hedgehog. Toto zjištění je v souladu s předchozími důkazy, že protein SIVA-1 má specificky u nemalobuněčného karcinomu plic onkogenní roli.

Klíčová slova: nemalobuněčný karcinom plic, karcinogeneze, signální dráha Hedgehog, protein SIVA-1

Abstract

Non-small cell lung cancer belongs to most frequent malignant tumours at all worldwide. Despite significant progress in knowledge about etiopathogenesis and targeted anticancer therapy, basic scientific research in this particular field and development of more effective treatment remains challenging. In case of its inadequate activation, the Hedgehog signaling pathway is involved in non-small cell cancer development. P53 is well known tumour suppressor gene, that serves as anticancer barrier. Its activity is mostly determined by the transcriptional activation of many pro-apoptotic genes, one of which is SIVA-1. Recently, it has been surprisingly shown, that SIVA-1 has also pro-oncogenic properties in a mouse model of non-small cell lung cancer. The aim of this study was to clarify the importance of Hedgehog signaling pathway and protein SIVA-1 and their potential relationship in development and progression of human non-small cell lung cancer. In selected cell lines of human non-small cell lung cancer, expression of each single component of Hedgehog signalign pathway was detected. In the tissue samples of tumour obtained from 39 patients that underwent surgery for non-small cell lung cancer and selected cell lines of the same tumour, expression of SIVA-1 protein was revealed. These findings indicate the importance of both Hedgehog signaling pathway and SIVA-1 protein in development of non-small cell lung cancer. The crucial discovery of this study should be considered completely novel and original finding, that protein SIVA-1 activates prooncogenic Hedgehog signaling pathway. This finding is consistent with previous evidence, that SIVA-1 protein has specific prooncogenic role in non-small cell lung cancer.

Keywords: non-small cell lung cancer, carcinogenesis, Hedgehog signaling pathway, SIVA-1 protein

1. Úvod

1.1. Bronchogenní karcinom

1.1.1 Epidemiologie a rizikové faktory

Bronchogenní karcinom je nejčastějším plicním nádorem (99 % všech maligních plicních nádorů) a patří mezi nejčastěji se vyskytující typ zhoubného onemocnění u člověka. V roce 2020 zhoubná onemocnění plic celosvětově zapříčinila odhadem na 1,8 milionů úmrtí (Sung H. et al., 2021). Ve Spojených státech amerických je evidováno přes 230 000 nových případů zhoubných plicních nádorů a 130 000 úmrtí na toto onemocnění ročně (Spiegel R. L. et al., 2021). V České republice bylo toto onemocnění v roce 2018 4. nejčastěji diagnostikovaným zhoubným nádorem kromě nemelanomových kožních nádorů. V tomtéž roce bylo diagnostikováno v České republice 6 459 nových případů, incidence tedy byla 60,8 na 100 000 obyvatel. Poměr výskytu u mužů byl téměř dvojnásobný oproti výskytu u žen (1,9:1). Toto onemocnění bylo v roce 2018 v České republice v rámci onkologických diagnóz nejčastější příčinou úmrtí (19,2 % všech úmrtí na zhoubný novotvar kromě nemelanomových kožních nádorů). V období 2014–2018 byl v ČR střední věk nově nemocných 69 let, 50 % pacientů bylo ve věku 63–75 let (Krejčí D. et al., 2021).

Mezi nejdůležitější rizikový faktor zodpovědný za vznik bronchogenního karcinomu je kouření tabákových produktů, primárně cigaret. Odhaduje se, že kouření cigaret se podílí na vzniku až 90 % případů všech typů plicních nádorů (Alberg A. J., Samet J. M., 2003). Mezi známé karcinogeny v životním prostředí nebo na pracovišti podílející se na vzniku maligního onemocnění plic patří azbest a radon (Beckett W. S., 1993). Roli hraje i znečištění ovzduší a výfukové plyny (Raaschou-Nielsen O. et al., 2013). Radioterapie na oblast hrudníku pro jiné nádorové onemocnění zvyšuje následné riziko výskytu primárního plicního karcinomu. Lorigan et al. ve své práci uvádí, že u pacientů, kteří podstoupili radioterapii pro Hodgkinův lymfom, bylo relativní riziko rozvoje primární plicní malignity až 7krát vyšší a absolutní zvýšené riziko může trvat 20 až 25 let od radioterapie (Lorigan P. et al, 2005). Zánětlivá a chronická benigní onemocnění plic taktéž představují zvýšení rizika rozvoje zhoubného onemocnění plic. Toto riziko je zvýšené především u pacientů s historií plicního emfyzému, pneumonie a tuberkulózy (Brenner D. R. et al., 2012). Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) vzniká především na podkladě kouření cigaret. Na druhou stranu, CHOPN je sama o sobě rizikový faktor pro rozvoj plicní malignity nezávislý na kouření cigaret a zvyšuje riziko vzniku plicního nádoru 2krát až 5krát (Hopkins R. J. et al., 2017).

Pacienti s plicní fibrózou mají 8krát až 14krát zvýšené riziko pro rozvoj zhoubného plicního onemocnění, a to i když se započítá do úvahy věk, pohlaví a historie kouření cigaret (Turner-Warwick M. et al., 1980; Hubbard R. et al. 2000).

1.1.2 Klasifikace bronchogenního karcinomu

Bronchogenní karcinom je zhoubný nádor z epitelových buněk plic (bronchiální sliznice, výstelky alveolů, neuroendokrinní a exokrinní buňky). Z hlediska histopatologického a klinicko-terapeutického přístupu členíme zhoubné plicní epitelové nádory na dvě hlavní skupiny: malobuněčný plicní karcinom (small cell lung cancer; SCLC), který tvoří zhruba 15 % plicních karcinomů a nemalobuněčný plicní karcinom (non-small cell lung cancer; NSCLC), který tvoří přibližně 85 % všech plicních karcinomů a zahrnuje všechny typy mimo malobuněčného plicního karcinomu a karcinoidu (Inamura, 2017). Skupina nemalobuněčného plicního karcinomu se dále dle WHO klasifikace člení na následující nejčastější podtypy (Zheng M., 2016):

- Adenokarcinom – nejčastější, tvoří přibližně 40 %, dělí se na: lepidický, acinární, papilární, mikropapilární, solidní, invazivní mucinózní nebo smíšený, koloidní, fetální, enterický, minimálně invazivní (nemucinózní nebo mucinózní) a preinvazivní léze (atypická adenomatózní hyperplazie a adenokarcinom in situ)
- Skvamocelulární (dlaždicobuněčný) karcinom – tvoří zhruba 20 %, dále je rozlišován: rohovějící, nerohovějící, bazaloidní a preinvazivní léze dlaždicobuněčný karcinom in situ
- Adenoskvamózní karcinom – vzácný, tvoří méně než 5 % všech zhoubných nádorů plic, obsahuje jak složku adenokarcinomu, tak dlaždicobuněčného karcinomu se zastoupením obou z komponent v nádoru nad 10 %
- Velkobuněčný karcinom – tvoří méně než 3 %, postrádá specifickou diferenciaci, histomorfologická diagnóza per exclusionem při chybění znaků glandulární, dlaždicobuněčné či neuroendokrinní diferenciace. Diagnóza nemůže tedy být bezpečně stanovena pouze na základě vyšetření bioptického vzorku, proto je v těchto situacích užíván termín „nemalobuněčný karcinom plic jinak nespecifikovaný“ (non-small cell lung cancer, not otherwise specified, NSCLC NOS). Existuje vzácná varianta s neuroendokrinní diferenciací, která je však řazena mezi neuroendokrinní nádory plic.

- další histologické varianty jsou již velmi vzácné a na tomto místě jsou uvedeny pro úplnost
 - pleomorfní karcinom
 - vřetenobuněčný karcinom
 - obrovskobuněčný karcinom
 - karcinosarkom
 - plicní/pulmonální blastom
 - karcinom typu slinných žláz – mukoepidermoidní, adenoidně cystický a epiteliálně myoepiteliální karcinom
 - ostatní a neklasifikované karcinomy
 - lymfoepiteliomu podobný karcinom
 - NUT (nuclear protein in testis) karcinom

1.1.3 Molekulární diverzita bronchogenního karcinomu a genetické abnormality jako léčebné cíle

Molekulární podstata vzniku a progresu bronchogenního karcinomu je v základních principech obdobná jako u ostatních maligních nádorů. Podle současného pohledu je karcinogeneze vícestupňový proces dlouhodobé přeměny genotypu, kdy v průběhu let až desítek let dochází k postupné akumulaci více (zpravidla nejméně 5 až 6) genetických a/nebo epigenetických alterací, na jejichž podkladě vzniká maligně transformovaná buňka. Tato maligně transformovaná (nádorová) buňka se dále nekontrolovaně dělí. Obecně je uznáváno, že maligní nádory mají monoklonální původ, což znamená, že všechny buňky nádoru pocházejí z jedné původní maligně transformované buňky.

Na druhou stranu je známo, že v rámci jednoho nádoru lze identifikovat tzv. subklony s odlišným genotypem, které však vznikly až v průběhu vývoje nádoru kumulací dalších genetických změn. Na základě těchto procesů vzniká u jednoho nádoru tzv. nádorová mikroheterogenita. V jejím rámci existuje různé množství různě velkých subpopulací nádorových buněk s odlišným fenotypem, což se odráží i v citlivosti těchto mikroheterogenních populací k protinádorovým léčivům. Fenotypová nádorová mikroheterogenita je základním charakteristickým nádorovým znakem při progresi nádoru (Barber J. L. et al., 2015). Nádorových subpopulací mohou být stovky až tisíce, mohou obsahovat genetické a epigenetické změny a jsou hlavní překážkou cílené protinádorové

terapie. U všech karcinomů tato mikroheterogenita vzniká na základě procesu zvaného epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), která je spojena se změnou epiteliálního fenotypu v mezenchymální (Kalluri R., Weinberg R. A., 2009).

K nejdůležitějším nádorovým mikropopulacím patří tzv. nádorové kmenové buňky (cancer stem cells, CSC), které tvoří většinou 1-5 % buněk nádorů a ze kterých se rekrutují nejvíce agresivní/invazivní buňky s největší schopností metastazovat. Tyto nádorové kmenové buňky rovněž tvoří jakési „jádro nádoru“, které je velmi rezistentní vůči protinádorovým léčivům a které má velmi významnou schopnost sebeobnovy a téměř nepodléhá apoptóze (Nguyen L. V. et al., 2012).

Rysy charakteristické pro buňky maligního nádoru jsou podle Hanahana a Weinberga definovány následovně (Hanahan D., Weinberg R. A., 2000):

- Soběstačnost v produkci růstových signálů a růstových faktorů
- Necitlivost/ztráta vnímavosti k signálům inhibujícím růst a proliferaci
- Schopnost uniknout/vyhnout se apoptóze
- Neomezený replikační potenciál
- Setrvalá angiogeneze
- Tkáňová invazivita a schopnost metastazování

Jak bylo v úvodu této podkapitoly zmíněno, maligní transformace buňky vzniká na podkladě kumulace genetických alterací zapříčiňující kvantitativní či kvalitativní změny v genetické informaci obsažené v DNA. Jedná se o alterace především v genech kódujících tzv. proto-onkogeny a tumor supresorové geny.

Proto-onkogeny jsou v normální nenádorové buňce klíčovým faktorem regulujícím biologické procesy. Savčí a ptačí genom obsahuje celou škálu pro-onkogenů, které zajišťují normální buněčnou diferenciaci a proliferaci (Kontomanolis E. N. et al., 2020). Proto-onkogeny nejčastěji kódují proteiny stimulující buněčné dělení, zpomalující buněčnou diferenciaci a zastavující buněčnou smrt, což jsou procesy důležité pro normální vývoj lidského organismu, orgánů a tkání. Konkrétněji, proto-onkogeny mohou kódovat jaderné transkripční faktory, růstové faktory, receptory pro růstové faktory, signální transduktory (protein kinázy, G proteiny) nebo anti-apoptotické faktory (Kontomanolis E. N. et al., 2020).

Mutované neboli aktivované proto-onkogeny jsou poté nazývány onkogeny a hrají ústřední roli v karcinogenezi. Genetické alterace právě těchto genů vedou k nadměrné expresi příslušných kódovaných proteinů, což vede ke zvýšenému buněčnému dělení, snížené buněčné diferenciaci a inhibici buněčné smrti, což jsou mimo jiné atributy maligně

transformované buňky (Chial H., 2008). Mezi hlavní mechanismy aktivace proto-onkogenů patří (Kontomanolis E. N. et al., 2020; Chial H., 2008):

- Bodové mutace DNA – delece nebo inserce vedoucí ke zvýšené aktivitě genových produktů (proteinů)
- Bodové mutace DNA – delece nebo inserce v oblasti promoteru proto-onkogenu vedoucí k zvýšení transkripce genových produktů (proteinů)
- Genová amplifikace – v rámci zmnožení chromozomálních částí dochází k navýšení kopií sice nemutovaného onkogenu, nicméně tato situace má však také za následek nadměrné množství proteinu v buňce
- Chromozomální translokace – dochází k přemístění proto-onkogenu do jiné oblasti chromozomu, kde dochází k vyšší expresi jeho proteinu
- Chromozomální translokace – přemístění proto-onkogenu do jiné oblasti chromozomu vede k jeho splynutí (fúzi) s jiným genem, což vede ke vzniku fúzního genu produkujícího fúzní protein s onkogenní aktivitou

V současnosti je známo nejméně 50 až 60 onkogenů (Kontomanolis E. N. et al., 2020). Tyto geny tvoří aktuálně velmi důležitý cíl pro vývoj protinádorových léčiv.

Tumor supresorové geny za normální situace ve zdravé buňce potlačují neadekvátní buněčný růst a dělení nebo stimulují buněčnou smrt a udržují tak náležitou rovnováhu a stabilitu buněk v organismu. Některé z těchto genů se účastní v reparačních procesech DNA, čímž pomáhají předcházet kumulaci mutací v genech důležitých pro rozvoj maligního nádoru (Chial H., 2008). Chybění nebo inaktivace tumor supresorového genu zásadním způsobem přispívá k malignímu zvratu buňky (Nenclares P., Harrington K., 2020). Na rozdíl od proto-onkogenů je ke ztrátě funkce tumor supresorového genu většinou nutná permanentní inaktivace nebo ztráta tohoto genu na obou alelách chromozomu. V současnosti je známo více než 30 tumor supresorových genů (Chial H., 2008).

Tumor supresorové geny lze klasifikovat do následujících kategorií (Wang L. et al., 2018):

- Geny kódující intracelulární proteiny, které kontrolují postup do specifické fáze buněčného cyklu – například pRB a p16
- Geny kódující receptory nebo signální transduktory pro hormony nebo faktory inhibující buněčnou proliferaci – například TGF- β a APC

- Geny kódující kontrolní proteiny, které zastavují buněčný cyklus v odpovědi na poškození DNA nebo chromozomální defekty – například BRCA1, p16 a p14
- Geny kódující proteiny, které indukují apoptózu – například p53
- Geny kódující proteiny zapojené do oprav chyb a poškození DNA – například p53 a MSH2

Jak bylo zmíněno výše, mutace a genetické alterace jsou nedílně spjaty s rozvojem maligního nádoru včetně bronchogenního karcinomu a jejich detekce má tak význam diagnostický ale i léčebný. Mutace, které v karcinogenezi poskytují buňce růstovou výhodu, jsou označovány jako řídicí (driver) mutace. Počet driver mutací projevující se na výsledném efektu karcinogeneze je omezený. Většina solidních nádorů vykazuje přibližně okolo 40 až 150 „non-silent“ mutací, z nichž většina je považována pouze za doprovodné (passenger) mutace, které nepřispívají k malignímu fenotypu buňky (Wadowska K. et al., 2020).

Bronchogenní karcinom je oproti některým jiným maligním nádorům význačný vysokou mutační náloží (tumor mutational burden, TMB), která vyjadřuje počet somatických mutací v nádorovém genomu. Tento fakt může souviset s kouřením a expozici xenobiotikům obsaženým v tabákovém kouři (Zito Marino F. et al., 2019). Kan a kolektiv provedli studii na 441 nádorech se zvláštní pozorností k poměru výskytu protein alterujících mutací. Bylo zjištěno, že mezi analyzovanými tumory patřil právě nemalobuněčný plicní karcinom k těm s nevyšším poměrem výskytu protein alterujících mutací s hodnotami 3,5 mutace na megabazi u plicního adenokarcinomu a 3,9 mutace na megabazi u dlaždícobuněčného karcinomu plic. V kontrastu s tímto zjištěním například karcinom prostaty vykazoval v této práci pouze 0,33 protein alterujících mutací na megabazi a průměrný mutační poměr napříč všemi zkoumanými nádory byl 1,8 protein alterujících mutací na megabazi (Kan Z., 2010).

Mezi nejčastěji mutované proto-onkogeny u nemalobuněčného karcinomu plic patří geny z rodiny MYC, RAS a HER. Z tumor supresorových genů jde pak o TP53, Rb a p16. Bylo zjištěno, že mutace genu TP53 je častější u dlaždícobuněčného karcinomu plic, a naopak mutace genu KRAS je častější u adenokarcinomu plic (Ahrendt, S. A., 1999). V počátcích odhalování molekulárního pozadí a genetických alterací u nemalobuněčného plicního karcinomu byla nová zjištění vázána téměř výhradně právě na adenokarcinom, až následný rozvoj metod molekulární biologie umožnil hlubší analýzu a lepší molekulární charakterizaci dalších histologických subtypů bronchogenního karcinomu. Mezi prvními identifikovanými mutacemi byly právě mutace genů KRAS a TP53 (Wadowska K. et al.,

2020). Po objevu mutace v kinázové doméně receptoru pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor, EGFR) v roce 2004 se zásadně změnilo dosavadní pojetí léčby bronchogenního karcinomu. Další pokrok pak znamenal objev přestaveb genů ALK a ROS v roce 2007. Mutace v genech pro KRAS a EGFR byly stejně jako přestavby v genech ALK a ROS identifikovány téměř výhradně u plicního adenokarcinomu. KRAS je popisován jako nejčastěji mutovaný onkogen u nemalobuněčného karcinomu plic (20-35 %). Aktivační mutace genu pro EGFR se pak vyskytuje přibližně v 15 %. Přestavby genů ALK nebo ROS1 jsou ještě vzácnější (méně než 5 %) ale jsou častější u mírných kuřáků a nekuřáků (Wadowska K. et al., 2020). Genetické alterace ve zmíněných genech (EGFR, ALK, ROS1) mohou u nemalobuněčného karcinomu plic predikovat dobrou odpověď na specifickou terapii inhibitory tyrosin kináz (tyrosine kinase inhibitor, TKI). Mezi další důležité mutované geny představující vhodné cíle pro specifickou terapii u nemalobuněčného karcinomu plic patří BRAF, ERBB2, MET či RET. Současné moderní metody molekulární biologie přinesly zjištění, že přestože v jednom tumoru je detekovatelná řada genetických alterací, tak koexistence více než jedné driver mutace v rámci jednoho nádoru není častá (Wadowska K. et al., 2020). Podle studie Scholla a kolektivu, která zkoumala molekulární pozadí u 1007 adenokarcinomů plic, byl současný výskyt více než jedné driver mutace v jednom nádoru přítomen pouze ve 3 % (Sholl L. M. et al., 2015).

Co se týče rozdílnosti molekulárních alterací (v rámci nemalobuněčného karcinomu plic) u adenokarcinomu a dlaždicobuněčného karcinomu, tak původně byla molekulární diagnostika dlaždicobuněčného karcinomu plic stanovena na základě absence přítomnosti mutací již známých u adenokarcinomu, jako například zmíněné mutace EGFR nebo ALK (Sands L. M. et al., 2020). Devarakonda a kolektiv ve své práci analyzovali molekulární profil nemalobuněčných plicních karcinomů u 908 pacientů a výsledky nepřekvapivě potvrdily rozdíly v četnosti mutací mezi adenokarcinomem a dlaždicobuněčným karcinomem, kdy aktivační mutace genů KRAS, HRAS, NRAS a EGFR charakteristické pro plicní adenokarcinom byly zjištěny pouze asi u 3 % dlaždicobuněčných karcinomů plic (Devarakonda S. et al., 2018). Díky dalším novým metodám jako je sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS) pak bylo možno více prozkoumat a identifikovat genetické alterace specifických genů i u dlaždicobuněčného karcinomu plic. Podle současných výzkumů jde především o amplifikace v genech CCND 1-3, CDK4, FGFR 1-3, MET, PDGFRA, PIK3CA, SOX2), fúzní gen FGFR3-TACC3, mutace v tumor supresorových genech PTEN, TP53 a bodové mutace v genech EPHA2, AKT1, DDR2.

Některé z těchto genů mohou být také cílem specifické protinádorové terapie (Sands L. M., 2020; Kan Z. et al., 2010).

Lze shrnout, že již celá řada klinických doporučení i na národních úrovních označuje některé driver mutace, jako například EGFR, KRAS, BRAF, HER2, ALK, ROS1, RET nebo MET, za jakýsi základní výčet charakteristických mutací u nemalobuněčného plicního karcinomu s následnými terapeutickými konsekvencemi (Zhang X. et al., 2019).

EGFR mutace – receptor pro epidermální růstový faktor patří do rodiny transmembránových receptorů s tyrosinkinázovou aktivitou. EGFR signalizační dráha patří mezi nejdůležitější transdukční dráhy v savcích buňkách regulující řadu stěžejních buněčných procesů jako například proliferace, diferenciace, migrace, apoptóza a účastní se také při regulaci mezibuněčné komunikace během vývoje. Jak již bylo zmíněno, mutace v tomto genu se vyskytuje asi v 15 % adenokarcinomu plic. V asijské populaci je však incidence této aktivační mutace podstatně častější, a to až v 62 % (Shi Y. et al., 2014). Přítomnost této mutace predikuje citlivost k následujícím cíleným inhibitorům tyrosinkináz: erlotinib, gefitinib, afatinib, dacomitinib a osimertinib.

ALK přestavba – anaplastická lymfom kináza patří taktéž do rodiny transmembránových receptorů s tyrosinkinázovou aktivitou. Vyskytuje se u lidí, myši a drosofil. Přesná fyziologická funkce není zcela objasněna, nicméně se předpokládá, že se ALK účastní v neuronální buněčné diferenciaci a regeneraci nebo při migraci svalových buněk (Salido M. et al., 2011). Chromozomální translokací dochází ke vzniku celé řady různých fúzních genů a následně transkriptů s účastí genu ALK. V případě nemalobuněčného plicního karcinomu se jedná především o fúzní gen EML4-ALK s onkogenním chováním, který vzniká inverzí na krátkém raménku chromozomu 2. Některé další práce zároveň upozorňují na přítomnost tohoto fúzního genu i u jiných druhů malignit, jako například karcinom prsu nebo kolorekta (Lin E. et al., 2009). U pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic přítomnost výše uvedené ALK přestavby silně predikuje citlivost k specifickým inhibitorům tyrosinkináz: crizotinib, ceritinib, alectinib, brigatinib nebo lorlatinib. Tato léčba může výrazně prodloužit dobu přežití bez progresu onemocnění (Lin E. et al., 2009).

ROS1 přestavba – c-ROS onkogen 1 je stejně jako výše uvedené gen pro transmembránový receptor s tyrosinkinázovou aktivitou. Fyziologická biologická role genu ROS1 v lidském organismu dosud není přesvědčivě známa. Chromozomální translokací může vzniknout v současnosti 7 známých fúzních genů s účastí ROS1, z nich u nemalobuněčného karcinomu plic jde o produkt CD74-ROS1. Sekvenační analýzy dále

prokázaly příbuznost ROS1 a ALK, což je podstatné pro ROS1 cílenou terapii, kdy některé (ale ne všechny) inhibitory tyrosinkináz proti ALK nesou duální inhibiční aktivitu proti ALK i ROS1 (Lin J. J., Shaw A. T., 2017). Z doposud vyvinutých a známých inhibitorů tyrosinkináz jsou pro první linii léčby pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic doposud regulačními orgány napříč různými státy schváleny dva: crizotinib a entrectinib (Remon J. et al., 2021).

MET abnormality – mezenchymálně epiteliální transiční faktor je receptor s tyrosinkinázovou aktivitou pro hepatocytární růstový faktor. Jeho mutovaná forma má zásadní roli při progresi maligních buněk, invazi a metastazování. Genetické aberace tohoto onkogenu charakteristické pro nemalobuněčný plicní karcinom jsou MET exon-14-skipping mutace (patologie sestřihu vedoucí k přeskočení exonu 14) a MET amplifikace. Mezi cílené inhibitory patří crizotinib, který taktéž inhibuje ALK a ROS1, a dále capmatinib nebo tepotinib (Bittoni M. et al., 2021).

RET přestavba – gen RET (z anglického rearranged during transfection) také kóduje receptor s tyrosinkinázovou aktivitou. Tento receptor se po aktivaci účastní v řadě intracelulárních signalizačních kaskádách, které regulují buněčné přežívání, proliferaci, diferenciaci, migraci nebo chemotaxi. Vlivem chromozomální přestavby mohou vznikat fúzní proteiny s genem RET. Pro nemalobuněčný plicní karcinom je typický fúzní gen KIF5B-RET, který se vyskytuje častěji u mladších pacientů s adenokarcinomem plic bez anamnézy kouření. Prevalence této genetické alterace u adenokarcinomu plic je přibližně 1 až 2 %. Mezi slibné specifické RET tyrosinkinázové inhibitory druhé generace pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic patří selpercatinib a pralsetinib (Drusbosky L. M. et al., 2021).

BRAF mutace – BRAF je serin/treonin protein kináza, která má významnou roli v přenosu intracelulárního signálu v rámci MAPK/Erk signální dráhy. Tato signální dráha je zodpovědná za buněčný růst a proliferaci. Aktivační mutace v genu pro BRAF jsou dobře známy především u maligního melanomu. Nicméně tyto mutace jsou přítomny i u dalších maligních nádorů včetně nemalobuněčného karcinomu plic, kde se vyskytuje téměř výhradně u histologického subtypu adenokarcinomu, a to přibližně v 1 až 2 % (Leonetti A. et al., 2018). Nejčastější mutace BRAF je V600E, tedy bodová mutace v exonu 15 vedoucí ke změně aminokyseliny valin na glutamát v kodonu 600. Tento typ mutace se vyskytuje v 50 až 80 % případů mutace BRAF (Leonetti A. et al., 2018). Ostatní mutace BRAF se pak označují souhrnně jako non-V600E mutace. Pro mutaci V600E existují specifické kinázové inhibitory dabrafenib a vemurafenib. Z důvodu možnosti současné aktivace MAPK/Erk dráhy i na dalších úrovních této signální kaskády než pouze skrze aktivační mutaci BRAF V600E, je

slibná kombinace inhibitoru aktivační mutace BRAF V600E s inhibitorem proteinkinázy MEK (např. trametinib), která za normálních okolností aktivuje transkripční faktor Erk jako koncový efektor celé signalizační kaskády MAPK/Erk vedoucí buněčnému růstu a proliferaci (Leonetti A. et al., 2018).

RAS mutace – skupina RAS onkogenů (z anglického rat sarcoma) za poslední desítky let patří mezi hojně studované driver onkogeny napříč mnoha nádorovými onemocněními. Jedná se o G-proteiny s významnou rolí v rámci intracelulární signální transdukce. Účastní se také ve výše uvedené signální dráze MAPK/Erk. Jejich aktivační mutace tak přispívá k malignímu fenotypu deregulací buněčného růstu. Mezi nejvýznamnější homologa rodiny RAS patří HRAS (Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog), KRAS (Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog) a NRAS (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog). Napříč všemi lidskými zhoubnými nádory je nejčastěji z těchto tří izoforem mutován KRAS (přibližně ve 22 %), poté NRAS (8 %) a HRAS (3 %) (Forbes S. A. et al., 2011). Aktivační mutace KRAS byly pozorovány u přibližně 20 až 25 % adenokarcinomu plic ve Spojených státech amerických a jsou spojovány s anamnézou kouření (O'Byrne K. J. et al., 2011). Mezi vysoce selektivní a účinné sloučeniny přímo cílené specificky proti aktivovanému KRAS patří sotorasib a adagrasib. Tyto ireverzibilní kovalentní nízkomolekulární inhibitory mají schopnost udržet patologicky aktivovaný KRAS v inaktivovaném stavu a vykazují slibné výsledky u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic nesoucí tento typ mutace (Malapelle U. et al., 2021).

Pro úplnost je třeba zmínit výčet základních molekulárně genetických vyšetřovacích metod užívaných v klinické praxi k diagnostice genetických abnormalit u nemalobuněčného karcinomu plic. Obecně lze vlastnosti ideální metody charakterizovat následovně: krátká doba do stanovení výsledku, dobrá efektivnost nákladů, schopnost stanovení z klinicky dostupných vzorků a částečně automatizovaný analytický proces. V praxi se výše uvedené genetické aberace stanovují na základě imunohistochemických metod nebo fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Do popředí se také dostává DNA a RNA sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS).

1.2 Signální dráha Hedgehog

1.2.1 Úvod

Jak bylo zmíněno výše, celá řada morfogenetických signálních drah regulujících vývojové procesy a homeostázu buněk organismu se při patologické aktivaci účastní v procesu rozvoje nemalobuněčného karcinomu plic. Studium nádorových kmenových buněk prokázalo, že nádory v repertoáru své genové exprese nesou i zárodečné vývojové znaky (Strizzi L. et al., 2009). V tomto světle jsou proto o to pozoruhodnější zjištění ze studie zabývající se inhibitory signální vývojové dráhy Hedgehog, že přerušení rané vývojové signalizace v nádorech může vést k terapeutickému benefitu (Rimkus T. K. et al., 2016; Merchant A. A., Matsui W., 2010). Například inhibitory dráhy Hedgehog blokují jak intrinsickou signalizaci v nádorových buňkách, tak extrinsickou signalizaci směrem k nádorovým stromálním buňkám nádoru vedoucí ke zpomalení růstu nádoru (Yauch R. L. et al., 2008). Obě tyto strategie tak využívají odlišné onkogenní funkce této signální dráhy. Je známo, že signální dráha Hedgehog je aktivována v různých zhoubných nádorech včetně právě nemalobuněčného ale i malobuněčného karcinomu plic, a proto by inhibitory této dráhy mohly být v budoucnu efektivními léčivy v cílené terapii tohoto zhoubného onemocnění.

1.2.2 Fyziologická funkce signální dráhy Hedgehog

Signální dráha Hedgehog za fyziologických okolností reguluje morfogenezi různých orgánů během embryogeneze (Ingham P. W., McMahon A. P., 2001). Tato dráha je u obratlovců zakonzervována a vysoce aktivní u savců během prenatálního vývoje, zejména při formaci neurální trubice, plic a skeletu. Následně je pak tato dráha neaktivní ve většině dospělých tkání. Nicméně, i postnatálně a v dospělosti se některé orgány (centrální nervová soustava a plíce) a jejich správné fungování spoléhají na pokračující signalizaci dráhy Hedgehog, která zde zprostředkovává signalizaci buněčné obnovy a orgánové homeostázy (Beachy P. A. et al., 2004; Merchant A. A., Matsui W., 2010). Molekulární mechanismy signální dráhy Hedgehog jsou komplexní a složité. V případě kanonické aktivace (začínající vazbou ligandu na receptor) signální dráhy Hedgehog byly identifikovány tři typy ligandů aktivujících tuto dráhu (Merchant A. A., Matsui W., 2010):

- Sonic Hedgehog
- Indian Hedgehog
- Desert Hedgehog

Výše uvedené ligandy mají schopnost vázat se na membránový receptor označovaný Patched (PTCH1). Jde o transmembránový receptor (spojený s G-proteinem, G-protein coupled receptor; GPCR), jehož polypeptidový řetězec 12krát prostupuje lipidovou dvouvrstvou buněčné membrány. Patched receptor v době, kdy na něj není navázán ligand, konstitutivně tlumí aktivitu dalšího transmembránového proteinu (taktéž z rodiny receptorů spojených s G-proteinem) nazývaného Smoothened (SMO). Pro úplnost je třeba uvést, že ligandy se kromě vazebného místa na receptoru Patched váží i na koreceptory na povrchu buněčné membrány (CDO, BOC a GAS1), čímž dochází k facilitaci vnímavosti k aktivaci signální dráhy. Po navázání jednoho ze tří ligandů na receptor Patched (a koreceptory) dojde ke změně jeho konformace a tím přestane tlumit aktivitu transmembránového proteinu Smoothened. To umožní jeho akumulaci v oblasti primární řasinky a fosforylaci na cytoplazmatickém konci. Aktivita Smoothened pak vede k inhibičnímu vlivu na protein Suppressor of fused (SUFU). Ten za normálních okolností (neaktivovaná dráha Hedgehog, bez navázaného ligandu) působí jako represor transkripčních faktorů GLI. Díky aktivitě Smoothened jsou tak transkripční faktory GLI uvolněny z represorového vlivu SUFU, fosforylovány a přesouvají se do buněčného jádra, kde ovlivňují transkripci mnoha genů včetně některých složek vlastní signální dráhy Hedgehog (například Patched nebo GLI1). SUFU je následně proteolyticky degradován (Abe Y., Tanaka N., 2016).

Rodinu transkripčních faktorů GLI u obratlovců tvoří tři proteiny: GLI1, GLI2 a GLI3. Všechny GLI proteiny obsahují aktivační doménu (GLI-A), GLI2 a GLI3 navíc obsahují i represorovou doménu (GLI-R). GLI2 je pravděpodobně hlavním aktivátorem Hedgehog signální dráhy, zatímco GLI3 hlavním represorem. GLI1 pak slouží spíše jako amplifikátor signálu pro GLI2 (Abe Y., Tanaka N., 2016). Aktuální poměr mezi výše uvedenými aktivačními a represivními formami proteinů GLI rodiny vede k expresi příslušných cílových genů. Mezi tyto geny patří geny kódující antiapoptotické proteiny (např. bcl-2 nebo survivin), proteiny urychlující buněčný cyklus nebo například sox-2, což je marker pluripotentních kmenových buněk.

Signální dráha Hedgehog má zásadní roli v průběhu embryonálního i postnatálního vývoje plic (Kugler M. C. et al., 2015). Během embryonálního vývoje jednotlivé signální molekuly dráhy Hedgehog významně mění vzorec i míru genové exprese. Vzorec genové exprese aktivovaný ligandem Sonic Hedgehog mezi 10. a 17. dnem embryonálního vývoje je důležitý pro veškeré větvení a růst bronchů, poté se omezuje jen na podskupinu epiteliálních buněk (Miller L. A. et al., 2001). Přestože je míra exprese proteinů Sonic Hedgehog a Patched nižší v období kolem narození, pořád přetrvává v epiteliálních buňkách plic (Bellusci

S. et al., 1997). Experimentální utlumení signální dráhy Hedgehog u postnatálních plic dokonce vede k abnormálnímu zrání plic. Signální dráha Hedgehog je tedy zapojena i v postnatální maturaci plic (Liu L. et al., 2013; Hyman J. M. et al., 2009). Ve zdravých plicích dospělého člověka pak signální dráha Hedgehog zajišťuje buněčnou stabilizaci a reguluje buněčnou obnovu (Peng T. et al., 2015). Nadále však zůstává neobjasněno, jak signální dráha Hedgehog na jedné straně podporuje buněčnou stabilitu a stálost a na druhé straně má důležitou roli při karcinogenezi (Abe Y., Tanaka N., 2016).

1.2.3. Význam signální dráhy Hedgehog v karcinogenezi

Prvotně byla patologicky aktivovaná signální dráha Hedgehog spojována se vznikem bazocelulárního karcinomu a meduloblastomu (Reda J. et al., 2018). Dnes je však známo, že konstitutivní aktivace této signální dráhy přispívá k rozvoji mnoha typů maligních nádorů (například kůže, plic, žaludku nebo tlustého střeva), kde vede k proliferaci a metastazování nádorových buněk a přežívání nádorových kmenových buněk (Rubin L. L., de Sauvage F. J., 2006). Existuje více mechanismů, kterými může patologicky aktivní dráha Hedgehog přispívat k rozvoji nádoru. Jde o mutace v genech kódující komponenty této dráhy (Patched, Smo, SUFU, GLI) a/nebo způsobující nadprodukcii příslušných ligandů (Sonic, Indian a Desert Hedgehog), což obojí vede v konečném důsledku k její aberantní aktivaci. Patologická nadprodukce ligandu pak působí jednak autokrinně na samotné nádorové buňky, ale i parakrinně na buňky nádorového stromatu (fibroblasty asociované s nádorem) (Theunissen J. W., de Sauvage F. J., 2009). Dále je možná i nekanonická aktivace této signální dráhy (bez nutnosti vazby ligandu na receptor), kdy může být nekanonicky aktivován transkripční faktor a efektor Hedgehog dráhy GLI, a to skrze tyto signální dráhy nebo molekuly: TGF- β , EFR, RAS a mTOR (Abe Y. Y., Tanaka N., 2016).

1.2.4 Signální dráha Hedgehog u nemalobuněčného karcinomu plic

Různé studie prokázaly, že dráha Hedgehog je aktivní i u nemalobuněčného karcinomu plic. Vyšší exprese GLI-cílových genů (například FOXM1, BMI1 či NANOG) byla zaznamenána u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Gialmanidis I. P. et al., 2013; Gialmanidis I. P. et al., 2009). Bermudez a kolektiv prokázali, že buňky nemalobuněčného karcinomu plic mohou produkovat ligand Sonic Hedgehog, který parakrinně aktivuje dráhu Hedgehog ve fibroblastech nádorového stromatu, a tím indukuje

jejich proliferaci (Bermudez O. et al., 2013). Huang a kolektiv zkoumali deregulovanou expresi komponent dráhy Hedgehog (PTCH, SMO a GLI2) v buněčných liniích nemalobuněčného karcinomu plic a zjistili, že použití SMO inhibitoru nebo SMO knockdown vedl k minimální inhibici proliferace, zatímco inhibice GLI2 signifikantně suprimovala buněčnou proliferaci a stimulovala extenzivní apoptózu. Tím prokázali, že transkripční aktivita GLI je řízena i nekanonickou cestou (nezávisle na SMO) (Huang L. et al., 2014). Další studie poukazují i na autokrinní aktivaci dráhy Hedgehog u nemalobuněčného karcinomu plic. Agresivita tohoto typu nádoru je dána mimo jiné i jeho vlastností epiteliálně-mezenchymální tranzice. Choe a kolektiv zjistili, že exprese genů spojených s epiteliálně-mezenchymální tranzicí a aktivita dráhy Hedgehog byly deregulovány u adenokarcinomu plic a fibroblastů asociovaných s tímto nádorem (Choe C. et al., 2013). Aktivita stromálních fibroblastů v nádoru vede k remodelaci extracelulární matrix a přispívá tak k metastatickým vlastnostem nádoru.

Nádorové kmenové buňky představují samoobnovující se složku nádoru a podílejí se na přežívání nádoru i jeho případném relapsu (Valent P. et al., 2021). Udržování populace nádorových kmenových buněk v některých typech nemalobuněčného karcinomu plic je také regulováno autokrinně skrze patologicky aktivovanou signální dráhou Hedgehog (Abe Y., Tanaka N., 2016).

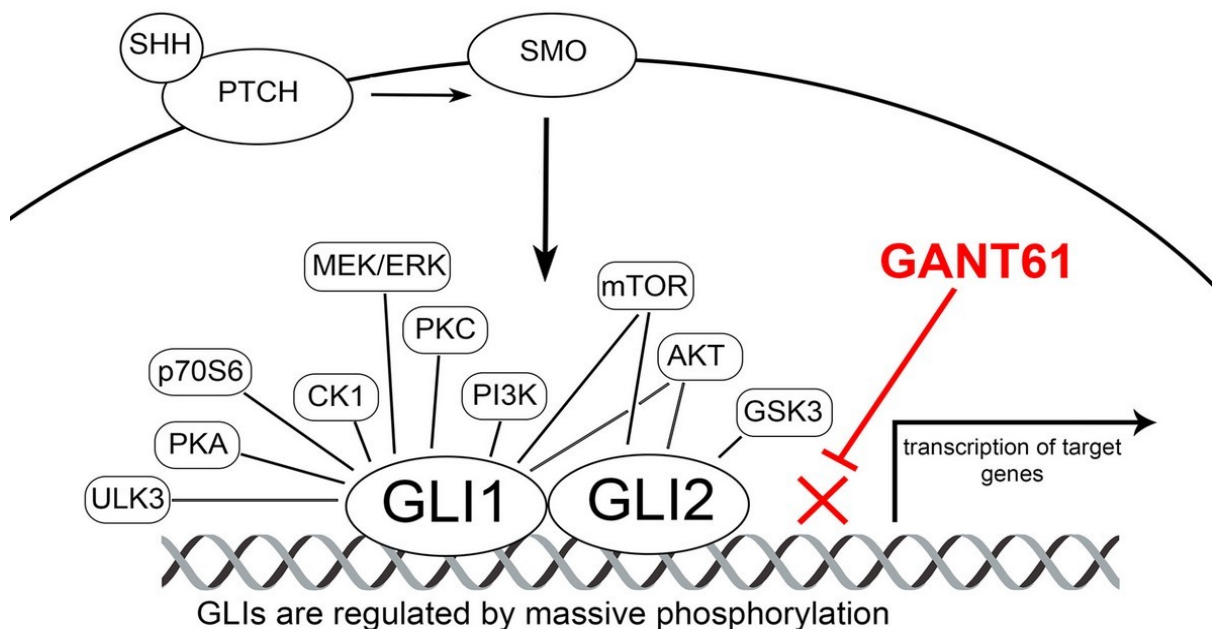
Mnoho prací zabývajících se rolí signální dráhy Hedgehog u nemalobuněčného karcinomu plic naznačuje, že efektorové transkripční faktory této dráhy GLI1 a GLI2 zastávají ústřední roli v progresi nádoru, metastazování a udržování populace nádorových kmenových buněk. Mechanismy aktivace faktorů GLI jsou odlišné napříč různými typy nádorových buněk a buněk okolního nádorového mikroprostředí. Obecně lze tak říci, že faktory GLI mohou být aktivovány nejrůznějšími signálními cestami zahrnujícími samozřejmě autokrinní i parakrinní aktivaci dráhy Hedgehog, stejně tak jako některými jinými kanonickými drahami a nekanonickou cestou (Abe Y., Tanaka N., 2016).

1.2.5 Cílená léčba aktivované dráhy Hedgehog u nemalobuněčného karcinomu plic

Dosud publikované studie popsaly, že objem nádoru a rekurence byly potlačeny cílenými inhibitory Hedgehog dráhy nebo kombinací inhibitorů Hedgehog dráhy a jiného typu protinádorového léčiva, jako například inhibitory tyrosinkinázy nebo platinovým derivátem (Abe Y., Tanaka N., 2016).

Della Corte a kolektiv prokázali, že použití inhibitoru SMO (Sonidegib) vedlo v buněčných liniích nemalobuněčného karcinomu plic rezistentního vůči tyrosinkinázovému inhibitoru gefitinibu k oslabení nádorového růstu. Navíc u této buněčné linie byla pozorována i aktivace onkogenu MET a použití kombinace inhibitoru SMO a inhibitoru MET vedla k dalšímu potlačení objemu nádoru (Della Corte C. M. et al., 2015).

Knockdown genu pro GLI1 vede k potlačení formování nádoru i nádorového okolí. Není proto překvapením, že jak inhibitory SMO, tak inhibitory GLI jsou předmětem dalšího zkoumání. Mezi dosud známé inhibitory GLI patří především: GANT-58 (z anglického GLI-antagonist), GANT-61, HPI-1 (z anglického Hedgehog pathway inhibitor), Genistein a GlabrescioneB (GlaB) (Infante P. et al., 2015). Schéma signální dráhy Hedgehog, jejích komponent a působení inhibitoru GANT je uvedeno na **Obrázku 1** (Reda J. et al., 2018). Protože dráha Hedgehog a faktory GLI mají důležitou roli při progresi plicních nádorů a udržování populace plicních nádorových kmenových buněk, jsou jejich inhibitory příslibem pro efektivnější léčbu nemalobuněčného karcinomu plic. Pro vývoj efektivního inhibitoru Hedgehog dráhy je však nutné i další hlubší porozumění regulačních mechanismů GLI-zprostředkované transkripce.



Obrázek 1. Schématické zobrazení signální dráhy Hedgehog, jejích komponent včetně efektorového místa inhibitoru GANT61

1.3 Signální dráha mTOR

1.3.1 Úvod

Mezi další dráhy podílející se na nádorovém fenotypu patří signální dráha mTOR. Je známo, že zvýšená aktivita této dráhy vede zisku nádorových vlastností, jako je například získaná růstová autonomie, inhibice apoptózy, setrvalá angiogeneze, zvýšená tkáňová invazivita a metastazování a necitlivost k signálům potlačujícím růst (Tan A. C., 2020). Z tohoto pohledu mTOR dráha představuje atraktivní cíl pro vývoj nových protinádorových léčiv.

1.3.2 Fyziologická funkce signální dráhy mTOR

Dráha mTOR, celým názvem fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mechanistic target of rapamycin (mTOR), je signalizační kaskáda zásadní pro buněčný růst a metabolismus. mTOR je serin/treonin proteinkináza nacházející se přibližně uprostřed signálně transdukční dráhy. Může být součástí komplexů mTORC1 a mTORC2.

Ligandem pro receptor aktivující tuto dráhu může být mnoho různých růstových faktorů, cytokinů nebo hormonů. Ve všech komponentech této dráhy platí, že fosforylace proteinkinázy vede k její aktivaci. Po navázání ligandu na receptor je fosforylací aktivována kináza fosfatidylinositol 3-kináza (PI3K). Tato kináza fosforyluje druhého posla, kterým je fosfoinositol-2-fosfát (PIP2) za vzniku fosfoinositol-3-fosfát (PIP3). PIP3 je poté aktivním druhým poslem, který je schopen katalyzovat fosforylaci kinázy Akt (neboli proteinkinázy B, PKB). Proteinkináza B je fosforylována (aktivována) několika různými proteinkinázami. Jednou z těchto proteinkináz je fosfoinositidylnáza 1 (PDK1) a tato je rovněž fosforylována kinázami za podpory druhého posla PIP3. PDK1 je jednou z proteinkináz důležitých pro fosforylaci kinázy Akt (neboli PKB). Kináza Akt dále fosforyluje (a tedy aktivuje) kinázu mTOR. Zajímavostí je, že kináza mTOR je obecně většinou nejméně fosforylovanou kinázou (rozdíl mezi fosforylovanou a nefosforylovanou formou je nejmenší) v celé dráze, což je pravděpodobně způsobeno tím, že mTOR je součástí větších komplexů. Aktivovaná kináza mTOR dále fosforyluje S6kinázu-1, která poté fosforyluje (aktivuje) protein S6, což je ribozomální protein a aktivuje také další substráty. Skrze protein S6 jsou tak aktivovány anabolické metabolické procesy buňky.

1.3.3 Význam signální dráhy mTOR v karcinogenezi

Důležitost signální dráhy PI3K/Akt/mTOR při vzniku a progresi maligních nádorů je známa. Mutace či amplifikace v genu PIK3CA, který se podílí na expresi PI3K, byla prokázána u karcinomu jater, prsu, tlustého střeva, ovaria, žaludku i plic. Alterace dalších složek dráhy, jako například genu PTEN, který má regulační funkci (brání další postup signální transdukce defosforylací PIP3 zpět na PIP2), nebo genu pro Akt jsou taktéž asociovány s karcinogenezí (Tan A. C., 2020).

1.3.4. Signální dráha mTOR u nemalobuněčného karcinomu plic

Mutace a amplifikace v genu PIK3CA vedou k patologicky zvýšené aktivitě PI3K a byly prokázány u nemalobuněčného karcinomu plic. Scheffler a kolektiv analyzovali nemalobuněčné plicní karcinomy od 1144 pacientů a pomocí sekvenování nové generace hledali mutaci PIK3CA u této skupiny. Mutace byla přítomna u 3.7 % pacientů s predominancí u dlaždicobuněčného karcinomu (8.9 %) oproti adenokarcinomu (2.9 %). Důležitým zjištěním této práce pak také bylo, že u 57.1 % pacientů s touto mutací byla zároveň detekována přítomnost některé z dalších onkogenních driver mutací (EGFR, ALK, BRAF či KRAS) (Scheffler M. et al., 2015).

Homozygotní i heterozygotní delece v genu pro PTEN vedou k deregulaci produkce PIP3 a tím vedou k patologické onkogenní aktivaci dráhy mTOR. Tyto aberace byly taktéž doloženy u nemalobuněčného karcinomu plic. Soria a kolektiv prokázali při imunohistochemické analýze 125 resekátů nemalobuněčných plicních karcinomů ztrátu PTEN exprese u 24 % z nich (Soria J. C. et al., 2002).

Up-regulace kinázy Akt u nemalobuněčného karcinomu plic byla dokumentována v různých studiích. Například studie Balsary a kolektivu na 110 nemalobuněčných karcinomech plic pomocí imunohistochemie prokázala zvýšenou aktivitu Akt kinázy u 51 % z nich (Balsara B. R. et al., 2004).

Patologicky zvýšená aktivita kinázy mTOR, podle níž je signální dráha pojmenována, je rovněž dobře popsána u nemalobuněčného karcinomu plic. V různých studiích byl doložen zvýšený výskyt fosforylované a tedy aktivované mTOR kinázy (p-mTOR) až u 90 % pacientů s plicním adenokarcinomem, 60 % pacientů s plicním velkobuněčným karcinomem a 40% pacientů s dlaždicobuněčným karcinomem plic (Tan A. C., 2020). Důležitost mutace mTOR u plicního adenokarcinomu může navíc být dána i spojitostí s iniciačním faktorem

transkripce eIF-4E, který má také onkogenní potenciál (Mamane Y. et al., 2004). Zvýšená aktivita mTOR může být také negativním prognostickým faktorem u pacientů s časným stadiem nemalobuněčného karcinomu plic. Několik studií prokázalo, že zvýšená exprese mTOR v těchto nádorech detekovaná imunohistochemicky byla spojena horším přežíváním (Gately K. et al., 2012; Dhillon T. et al., 2010).

Význam aberantně aktivované dráhy PI3K/Akt/mTOR pak může být ještě podstatnější v nádorech nemalobuněčného plicního karcinomu, kde je přítomna i další aktivační driver mutace, jako například EGFR nebo KRAS. Dobashi et al. ve své práci uvádí, že u pacientů s EGFR driver mutací byla přítomna podstatně zvýšená aktivace Akt/mTOR v 67 % případů (Dobashi Y. et al., 2011). Jak naznačují některé preklinické studie, tak důležitost aberantně zvýšené aktivace Akt u pacientů s mutací EGFR spočívá v tom, že může přispívat k rozvoji získané rezistence k cíleným inhibitorům EGFR a v případě aberantně zvýšené aktivace mTOR k rezistenci na inhibitory EGFR i KRAS (Jacobsen K. et al., 2017; Conde E. et al., 2006). Vzhledem k účasti na vzniku a progresi nemalobuněčného karcinomu plic i podílu na rozvoji jeho rezistence na cílenou protinádorovou léčbu je dráha PI3K/Akt/mTOR nadále atraktivním cílem dalšího onkologického výzkumu.

1.3.5 Cílená léčba aktivované dráhy mTOR u nemalobuněčného karcinomu plic

Dnes je ve vývoji celá řada inhibitorů různých komponent signální dráhy PI3K/Akt/mTOR, které jsou v různých fázích klinických studií u nemalobuněčného karcinomu plic. Inhibitory lze je rozčlenit do následujících kategorií (Tan A. C., 2020):

- Neselektivní pan-inhibitory I. třídy PI3K
- Selektivní inhibitory PI3K
- Akt inhibitory
- mTOR inhibitory
- kombinované inhibitory PI3K/mTOR

V současnosti lze shrnout, že na základě poznatků z provedených klinických studií fáze I a II nebyl prokázán očekávaný terapeutický efekt u neselektivních, ani u selektivních inhibitorů PI3K. Konečné a/nebo další průběžné výsledky hodnocení Akt inhibitorů a kombinovaných inhibitorů PI3K/mTOR jsou teprve očekávány (Tan A. C., 2020). mTOR inhibitory jsou široce užívány v transplantologii a jsou schváleny v onkologických indikacích pro léčbu světlobuněčného karcinomu ledviny, neuroendokrinních tumorů nebo karcinomu

prsu, nicméně u nemalobuněčného karcinomu plic dosavadní výsledky klinických studií hodnotící efekt monoterapie či kombinace mTOR inhibitoru s jiným protinádorovým léčivem zatím neukazují zcela přesvědčivé výsledky (Tan A. C., 2020). Další molekulárně biologický výzkum v této oblasti je tak nadále žádoucí.

1.4 Protein SIVA

1.4.1 Úvod

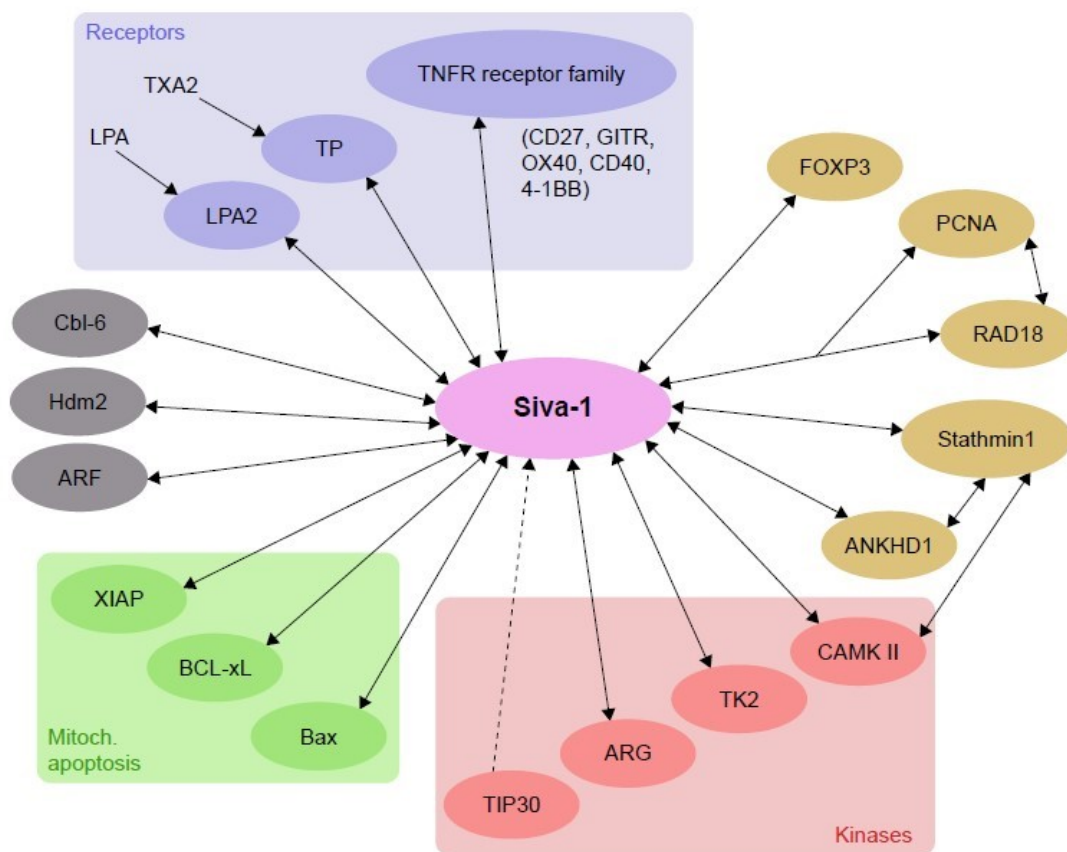
Gen p53 je známým tumor supresorovým genem. Mutace v tomto genu je dokumentována napříč mnoha zhoubnými nádory. Produkt tohoto genu, protein p53 je transkripční faktor, který na základě podnětů představující nebezpečí pro buňku (například poškození DNA, hyperproliferativní stimuly, nutriční deprivace buňky) spouští nebo zprostředkovává různorodé buněčné odpovědi na tyto podněty, čímž může působit také proti rozvoji maligní transformace. Mezi tyto odpovědi patří například apoptóza, zástava buněčného cyklu nebo autofagie (Vousden K. H., Prives C., 2009). P53 je především transkripční faktor (aktivátor transkripce), a tudíž uvedené buněčné odpovědi zprostředkovává skrze aktivaci transkripce příslušných cílových genů, jejich exprese pak v buňce vede k požadované odpovědi (Bieging K. T. et al., 2014). Přestože celá řada těchto cílových genů podílejících se na zprostředkování apoptózy a zástavě buněčného cyklu je dobře dokumentována, řada konkrétních genů přímo kritických pro protinádorové působení a jejich přesná funkce není zatím zcela detailně objasněna (Brady C. A. et al., 2011). Zajímavé je dále zjištění, že přestože p53 zprostředkovaná transkripční aktivita je kritická pro tumor supresorový efekt, řada p53 cílových genů, jako například p21 (CDKN1A), PUMA (BBC3) a NOXA (PMAIP1), jsou v tomto výsledném procesu postradatelné (Valente L. J. et al., 2013; Timofeev O. et al., 2013; Li T. et al., 2012). Klíčové mediátory p53 prostředkovaného tumor supresorového efektu tedy je třeba dále kontinuálně hledat.

Jedním z dalších p53 cílových genů je gen SIVA kódující stejnojmenný protein. Bylo prokázáno, že SIVA je přímý cílový gen pro p53 a uplatňuje se při procesu p53 zprostředkované apoptózy (Jacobs S. et al., 2007; Fortin A. et al., 2004). Z těchto důvodů je SIVA zajímavým předmětem dalšího základního onkologického výzkumu.

1.4.2 Fyziologická funkce proteinu SIVA

SIVA-1 je typický proapoptotický protein obvykle aktivovaný tumor supresorovým proteinem p53. Původně popsanou funkcí SIVA však byla interakce s cytoplazmatickou oblastí membránového receptoru CD27, což je člen super rodiny receptorů pro tumor necrosis factor (TNF) (Prasad K. V. et al, 1997). SIVA-2 je forma proteinu vzniknuvší alternativním sestřihem (splicing) s následným chyběním exonu 2. Protein SIVA-2 má také schopnost interakce s receptorem CD27, ale jeho proapoptotická aktivita je výrazně slabší, což bylo pozorováno na myším modelu (Yoon Y. et al., 1999).

Za fyziologických okolností je proapoptotický protein SIVA-1 regulován skrze p53. Mnoho situací v buňce může vést k SIVA-1 zprostředkované apoptóze, a zároveň při tom SIVA-1 dále interaguje s několika dalšími proteiny, které jsou také zapojeny do apoptózy. Tyto interakce jsou schematicky zobrazeny na **Obrázku 2** (Vachtenheim J. Jr et al., 2018).



Obrázek 2. SIVA-1 a interagující proteiny (použito s písemným souhlasem vydavatelství Dove Medical Press). Zkratky: mitoch: mitochondriální; další jednotlivé zkratky vybraných proteinů jsou uvedeny v textu spolu s jejich molekulárním mechanismem účinku

Mezi tyto další proteiny patří již zmíněná super rodina receptorů pro TNF (super rodina TNFR, tyto receptory jsou také označovány jako receptory smrti – death receptors), která kromě CD27 zahrnuje i GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor), OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) a CD40 (Spinicelli S. et al., 2002). Tato aktivace apoptózy proteinem SIVA-1 je označována jako extrinsická cesta.

Protein SIVA-1 však v experimentálních modelech prokázal schopnost indukovat apoptózu řadou různých mechanismů. Kromě uvedené extrinsické cesty jde o intrinsickou signalizaci apoptózy (mitochondrie dependentní), kde je účast proteinu SIVA-1 doprovázena také up-regulací transkripce genu BAX a kaspázy 3 a naopak sníženou expresí antiapoptotického genu BCL2 (Barkinge J. L. et al., 2009). Při terapii cisplatinou protein SIVA-1 zesiluje cisplatinou indukovanou apoptózu skrze tromboxanový receptor A2 (Iorio-Morin C. et al., 2012). Cao a kolektiv popsali, že protein SIVA-1 může být fosforylován kinázou Arg (ta je mimo jiné úzce spjata s kinázou c-Bcl), což je důležité pro zprostředkování oxidativním stresem indukované apoptózy (Cao C. et al., 2001). Další důležitou popsanou proapoptotickou funkcí proteinu SIVA-1 je, že interaguje s X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), což je protein silně inhibující apoptózu. Interakcí mezi XIAP, SIVA-1 a proteinem TAK1 (TGF- β -associated kinase 1) dojde ke vzniku komplexu a tím SIVA-1 jednak inhibuje XIAP-TAK1 zprostředkovanou aktivaci silně proonkogenní dráhy NF- κ B (Nuclear factor- κ B) a jednak zprostředkovává upřednostnění signalizační dráhy JNK a kaspáza 3-dependentní apoptózu (Resch U. et al., 2009). Vazbou proteinu SIVA-1 a receptoru LPA2 (lipophosphatidic acid 2), který zprostředkovává řadu buněčných procesů jako proliferaci, migraci, invazi a diferenciaci, dochází k ubikvitinaci obou struktur a jejich následné degradaci (Lin F. T. et al., 2007).

Další zajímavou funkcí proteinu SIVA-1 nesouvisející s proapoptotickou aktivitou je jeho interakce s proteinem stathim. Protein stathim (jiné názvy jsou metablastin či oncoprotein 18) je kritický faktor při regulaci buněčného cytoskeletu. Působí jako destabilizátor mikrotubulů, který depolymerizuje mikrotubuly skrze sekvestraci α/β -tubulinových heterodimerů (Li N. et al., 2011). Jak bylo již částečně naznačeno v předchozích kapitolách, epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) je spojena se změnou epiteliálního fenotypu v mezenchymální a tím propůjčuje maligním buňkám vyšší invazivitu a sklon k metastazování (Thiery J. P. et al., 2009). Protein SIVA-1 inhibuje aktivitu proteinu stathim, tím stabilizuje mikrotubuly cytoskeletu buňky a tímto mechanismem brzdí proces epiteliálně mezenchymální tranzice.

Alternative reading frame (ARF nebo také p14) je tumor supresorový protein, který váže a inhibuje onkogenní ubikvitin ligázu Hdm2 (u myši Mdm2). Ubikvitin ligáza Hdm2 za normálních okolností specificky připojuje ubikvitin k proteinu p53 a označuje jej tak k degradaci v proteazomu (Sherr C. J., Weber J. D., 2000). Protektivní efekt proteinu ARF vůči proteinu p53 může být oslaben mutacemi v genu pro ARF, které byly zaznamenány u maligních nádorů (Chen D. et al., 2010). ARF je po splnění svojí funkce taktéž proteazomálně degradován po ubikvitinaci ubikvitin ligázou ULF (Shimoda H. K., et al., 2010). Překvapující je tedy zjištění, že protein SIVA-1, který je přímým transkripčním cílem tumor supresorového proteinu p53, zároveň zesiluje Mdm2-zprostředkovanou degradaci proteinu p53 (Du W. et al., 2009). Později se prokázalo, že protein SIVA-1 je zároveň E3 ubikvitin ligáza pro ARF a tím představuje negativní zpětnovazebnou smyčku v regulaci stability proteinu p53 (Wang X. et al., 2013). Protein SIVA-1 je tak důležitým modulátorem ve složitém procesu degradace proteinu p53.

1.4.3 Význam proteinu SIVA-1 v karcinogenezi

Vzájemné působení proapoptotických a antiapoptotických signálu v buňce hraje zásadní roli při rozvoji maligního nádoru. Apoptóza je typ programované buněčné smrti charakterizovaný ve většině případů membránovou externalizací annexinu V, rozvolněním cytoskeletu, kondenzací chromatinu, fragmentací DNA a aktivací kaspáz (Vachtenheim J. Jr et al., 2018). Tumor supresorový protein p53 aktivuje expresi mnoha proapoptotických genů (například Bax nebo SIVA-1) a tím brání karcinogenezi. Kromě své typické proapoptotické funkce má protein SIVA-1 svou úlohu i v negativní zpětnovazebné regulaci hladiny p53. Protože je protein SIVA-1 zároveň ARF E3 ubikvitin ligázou a podílí se tím na degradaci proteinu p53, má u některých typů nádorů tím pádem vliv na přežívání a progresi maligních buněk (Wang X. et al., 2013). Proliferace maligních buněk v buněčných liniích lidského kolorektálního karcinomu s funkčním proteinem p53 byla po knockdownu proteinu SIVA-1 snížena oproti stejným buňkám s vyřazeným genem pro p53 a knockdownu proteinu SIVA-1. Toto zjištění naznačuje, že protein SIVA-1 vede k vyšší proliferaci stále ještě p53-závislým způsobem, a to pravděpodobně potlačením hladiny právě proteinu p53. To potvrzuje i práce, kdy down-regulace proteinu SIVA-1 pomocí shRNA vedla k inhibici tvorby a růstu nádoru u myši po xenotransplantaci buněk lidského osteosarkomu (p53 wild type) (Wang X. et al., 2013).

1.4.4. Protein SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic

Překvapujícím zjištěním bylo, že protein SIVA-1 působí i jako onkogenní faktor u nemalobuněčného karcinomu plic, což bylo potvrzeno experimenty na myším modelu (KRAS-dependentní mutanty) i na buněčných liniích lidského nemalobuněčného karcinomu plic v tkáňových kulturách (Van Nostrand J. L. et al., 2015; Resnick-Silverman L., Manfredi J. J., 2015). Zjednodušeně lze popsat, že v experimentální vyřazení genu SIVA-1 v těchto modelech bránilo rozvoji nemalobuněčného karcinomu (snížením proliferační kapacity), což naznačuje, že protein SIVA-1 je nezbytný pro facilitaci karcinogeneze in vivo (Van Nostrand J. L. et al., 2015; Resnick-Silverman L., Manfredi J. J., 2015). Knockdown genu SIVA-1 a následná deplece tohoto proteinu v buněčných liniích karcinomu pankreatu však nevedl k ovlivnění proliferace. Toto zjištění poukazuje na tkáňově specifickou roli proteinu SIVA-1 (Van Nostrand J. L. et al., 2015). Navazující analýzy ukázaly, že exprese SIVA-1 není v buňkách nemalobuněčného karcinomu plic závislá na p53. SIVA-1 knockout vedl pouze k nízkému počtu detekovaných kolonií buněk nemalobuněčného karcinomu plic na měkkém agaru, což byl další výsledek potvrzující nepostradatelnou roli SIVA-1 v rozvoji tohoto typu zhoubného nádoru (Resnick-Silverman L., Manfredi J. J., 2015).

Jak bylo také uvedeno výše, signální dráha NF- κ B je silně onkogenní a je inhibována proteinem SIVA-1. Farmakologická inhibice této dráhy však neovlivnila funkci proteinu SIVA-1, což naznačuje, že proonkogenní signalizace dráhy NF- κ B nemá podíl na onkogenní funkci proteinu SIVA-1 (Van Nostrand J. L. et al., 2015; Resnick-Silverman L., Manfredi J. J., 2015).

Dále bylo prokázáno, že knockdown genu SIVA-1 vede ke zvýšení autofagie (protinádorový efekt) a snížení metabolické aktivity. Navíc, SIVA-1 také zesiluje aktivitu dráhy mTOR fosforylací některých signálních komponent této dráhy (Van Nostrand J. L. et al., 2015), čímž přispívá ke zvýšení stimulace proliferace a metabolismu. Přestože zvýšení fosforylace (aktivace) konkrétních komponent dráhy mTOR nebylo dramatické, tento mechanismus může také alespoň částečně přispívat k proonkogenní funkci proteinu SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic.

Celkové přežití pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic s vyšší hladinou SIVA-1 bylo signifikantně horší, než u pacientů s nízkou hladinou SIVA-1 v tomto typu nádoru. Toto zjištění jednak přispívá k důkazům, že SIVA-1 je proonkogen u nemalobuněčného karcinomu plic a jednak může mít u tohoto nádoru i prognostický význam (Van Nostrand J. L. et al., 2015).

Lze shrnout, že SIVA-1 je proapoptotický protein donedávna známý především pro svojí tumor supresorovou funkci. Mechanismy této jeho funkce jsou různorodé. Nicméně, výzkum genu SIVA-1 a jeho proteinu v posledních letech přinesl důkazy o tom, že jeho tumor supresorová funkce není globální napříč různým typem nádorových buněk. Konkrétně byla prokázána tkáňově specifická proonkogenní funkce na myším modelu lidského nemalobuněčného karcinomu plic a v buněčných liniích. Protože některé prvotní analytické práce ukazují, že vyšší exprese SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic je spojena s horším celkovým přežitím, další základní a translační výzkum tohoto genu je nutný k objasnění přesného onkogenního mechanismu, stejně tak jako následný vývoj potenciální specifické protinádorové léčby.

2. Hypotézy a cíle práce

2.1 Vědecké hypotézy

2.1.1 Signální dráha Hedgehog a její význam u nemalobuněčného karcinomu plic

Signální dráha Hedgehog je velmi důležitá při embryonálním vývoji a hraje klíčovou roli při morfogenezi plic. Její význam se uplatňuje fyziologicky i postnatálně. V dospělosti je však také silně onkogenní u nemalobuněčného karcinomu plic. Přestože již byla signální dráha Hedgehog studována u mnoha typů plicních nádorů, není zatím detailní molekulární úloha a přesný mechanismus v komplexním procesu karcinogeneze u těchto nádorů plně objasněn. Další výzkum exprese jednotlivých složek a komponent signální dráhy Hedgehog včetně její inhibice u nemalobuněčného karcinomu plic může přispět k přesnějšímu poznání proonkogenního mechanismu u tohoto typu tumoru a potenciálně přispět k výzkumu na poli cílené protinádorové terapie.

2.1.2 Protein SIVA-1 a jeho význam u lidského nemalobuněčného karcinomu plic

V posledních letech se ukázalo na myším modelu nemalobuněčného karcinomu plic, že lidský protein SIVA-1 je nezbytný pro vznik geneticky indukovaného nemalobuněčného karcinomu plic. To značí, že funkce proteinu SIVA-1 při vzniku myšího nemalobuněčného karcinomu plic je tak zcela opačná (proonkogenní) než jeho funkce v ostatních somatických buňkách, kde působí typicky proapoptoticky (tumor supresor). Z tohoto důvodu je třeba další výzkum míry exprese a přesné funkce proteinu SIVA-1 u lidského nemalobuněčného karcinomu plic. Tato a další zjištění by v dlouhodobém horizontu mohla přispět k vývoji cílené protinádorové léčby u pacientů s tímto typem tumoru.

2.2. Cíle práce

2.2.1 Cíle výzkumu signální dráhy Hedgehog a její úlohy u nemalobuněčného karcinomu plic

1. Ověření exprese všech složek signální dráhy Hedgehog u plicních nádorů a pro srovnání i u dalších nádorových typů (jako kontrol).
2. Testování ovlivnění signální dráhy Hedgehog a proliferace buněk inhibitorem GANT61, což je inhibitor finálních transkripčních faktorů signální dráhy Hedgehog.

GANT61 s výhodou inhibuje kanonicky i nekanonicky aktivovanou signální dráhu Hedgehog.

3. Identifikace mechanismu eradikace nádorových buněk nemalobuněčného karcinomu plic po inhibici dráhy Hedgehog (předpokládaným mechanismem je apoptóza).

2.2.2 Cíle výzkumu proteinu SIVA-1 a jeho úlohy u nemalobuněčného karcinomu plic

1. Ověření proonkogenní role proteinu SIVA-1 (potvrzené na myším modelu) i na souboru vzorků lidského nemalobuněčného karcinomu plic. Zda zmíněné pozorování platí i pro lidské nádory není v době začátku této práce známo.
2. Určení mechanismu, jakým je protein SIVA-1 proonkogenní u lidského nemalobuněčného karcinomu plic.
3. Určení exprese proteinu SIVA-1 v panelu lidských buněk nemalobuněčného karcinomu plic a normálních bronchiálních epitelálních buněk.

3. Metodika

3.1 Studium signální dráhy Hedgehog

Tato část výzkumu probíhala v prostorech Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, kde je plně vybavené zázemí pro provádění širokého spektra molekulárně-biologických metod.

3.1.1 Buněčné kultury

Buněčné linie byly udržovány v odpovídajících podmínkách, tedy příslušných kultivačních médiích (DMEM nebo RPMI1640) doplněných 10 % telecím sérem (Gibco, Waltham, MA, USA), L-glutaminem, streptomycinem a penicilinem (Sigma, St. Luis, MO, USA). Některé buněčné linie byly kultivovány v EMEM médiu doplněném také o esenciální aminokyseliny a pyruvát (Sigma, St. Luis, MO, USA). Výměna za čerstvé médium probíhala každý třetí den. Přítomnost inhibitorů dráhy Hedgehog (GANT61 a cyclopamin) v kultivačních médiích je uvedena v příslušných obrázcích a jejich popisu (Reda J. et al., 2018).

3.1.2 Buněčné linie

Všechny použité buněčné linie byly lidského původu. Byly použity následující buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic: A549, H-1299, A-427, Calu-1, H-460, H-520, H596, H-661, H-2170 a SK-MES-1, které byly zakoupeny od American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). Další použité nádorové buněčné linie malobuněčného karcinomu plic (H-446, H-69, H-209, H-82, H-345, H-146, H-378, H-196), kolorektálního karcinomu (LoVo, SW480, HCT116), rhabdoidního tumoru (G-401 a A-204), osteosarkomu (U-2 OS a Saos-2), karcinomu děložního čípku (HeLa S3 a C33A), renálního karcinomu (293), fibrosarkomu (HT-1080), normálních lidských fibroblastů (IMR90 a WI-38), karcinomu nadledviny (SW-13), glioblastomu (T98G), T-buněčné leukémie (Jurkat), hepatocelulárního karcinomu (Hep-G2), neuroblastomu (SK-N-SH a SK-N-MC), maligního melanomu (MeWo, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, SK-MEL-3, Malme 3M, HT144, WM35, WM1552C, a RPMI-7931) a karcinomu pankreatu (PANC-1, PA-TU-8902, MIA PaCa-2, a cC-3) byly také zakoupeny od ATCC (Manassas, VA, USA). Další buněčné linie

maligního melanomu (DOR, Beu a Hbl) pocházely ze Svobodné univerzity v Bruselu (Dr. G. Ghanem). Buněčné linie normálních lidských melanocytů (HeMN-LP) byly zakoupeny od Cascade Biologics (Portland, OR, USA) a buněčné linie embryonálních renálních buněk (293FT) byly zakoupeny od firmy Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) (Reda J. et al., 2018).

3.1.3 Western blot

Western blot je analytická laboratorní metoda používaná k detekci specifického proteinu. Byly použity komerčně dostupné primární a sekundární protilátky od různých firem. Detailní popis je uveden v publikované práci (Reda J. et al., 2018). Pro analýzu Western blotů byly buňky lyzovány v RIPA pufru (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% deoxycholátu sodného, 0.1% SDS), doplněném inhibitory proteáz a fosfatáz - aprotinin, leupeptin, pepstatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), COMPLETE, and PhoStop (Roche, IN, USA). Celkové buněčné lyzáty byly rozděleny pomocí SDS-PAGE gelů a následně přeneseny na PVDF membránu (Millipore, Billerica, MA, USA). Membrány byly probovány příslušnými protilátkami a detekce byla provedena pomocí SuperSignalWest Pico Chemiluminescent substrate (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.1.4 Měření buněčné proliferace

Buňky byly trypsinizovány a v množství 40–50 % z každé linie bylo rozeseto na 12-jamkové kultivační platíčko (den 0). Od dalšího dne (den 1) bylo do jednotlivých buněčných linií aplikováno 10 μ M GANT61 nebo 20 μ M inhibitoru GANT61 (SelleckChem, Mnichov, Německo) po dobu 9. dnů. Médium bylo vyměňováno každý třetí den. Poté byla platíčka fixována ve 3 % roztoku paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (PBS), nabarvena 1 % krystal-violetí a fotodokumentována. Vždy dvě nejdůležitější jamky (9. den, kontrola a 20 μ M inhibitoru GANT61) byly kvantifikovány pomocí ImageJ software. Pokus byl dvakrát opakován se stejným výsledkem.

3.1.5 Detekce apoptózy

TUNEL assay (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labelling) je metoda určená k detekci apoptotické fragmentace DNA, používaná ke

kvantifikaci buněčné apoptózy. Při použití této metody bylo postupováno v souladu s pokyny a instrukcemi výrobce (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Výsledky barvení pomocí FITC (Fluorescein-5-isothiokyanát) byly analyzovány na průtokovém cytometru BriCyte EA (Mindray, Shenzhen, Čína). Celkově bylo v každém vzorku analyzováno 50 tisíc buněk. Počet apoptotických buněk byl kvantifikován pomocí ImageJ software. Detekce apoptózy pomocí fluorescence v mikroskopu Olympus X50 byla provedena tak, že buňky byly rozsety do NUNC (Roskilde, Dánsko) komůrek a následující den bylo přidáno 20 μ M inhibitoru GANT61 a podáváno po dobu 3 dnů a zároveň udržovány v médiu obsahujícím DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), což je barvivo s modrou fluorescencí, díky němuž lze identifikovat typické apoptotické obrazce indikující rozpad DNA (již většího rozsahu) při apoptóze. Obrázky jaderných apoptóz a kontrol byly zhotoveny fluorescenčním mikroskopem.

3.1.6 Metody s promoter-reporter plazmidy

Plazmid s genem pro reporterový enzym luciferázu obsahoval v promoteru 12xGLI plný konsensus a byl získán laskavostí prof. R. Toftgarda (Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden). Po transfekci plazmidu spolu s Renilla expresním luciferázovým plazmidem (sloužil jako referenční plazmid pro účinnost transfekce). Pokusy byly provedeny na 12-jamkových platíčkách, inhibitory GANT61 a cyclopamin byly přidány 20 hod před sklizením buněk. Reportérová aktivita byla měřena duálním luciferázovým kitem dle instrukcí výrobce (Promega, Madison, WI, USA). Byly provedeny vždy nejméně 2 experimenty se stejnými výsledky.

3.1.7 Statistické metody

K výpočtu statistické významnosti reporter studií a real-time PCR (použit při studiu proteinu SIVA-1) byl použit párový t-test. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr a směrodatná chyba, která je zobrazena graficky jako lišta u jednotlivých sloupečků. P-hodnoty jsou uvedeny v příslušném popisu obrázku. Měření buněčné proliferace, Western blot a TUNEL byly kvantifikovány pomocí ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Za statisticky signifikantní byla považována hodnota $p < 0.05$.

3.2 Studium proteinu SIVA-1

3.2.1 Soubor pacientů

Vzorky nemalobuněčného karcinomu plic byly získány od pacientů chirurgicky léčených pro tuto diagnózu na III. chirurgické klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní Nemocnice Motol v Praze. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Motol rozhodnutím ze dne 6. 1. 2016. Všichni pacienti, jejichž vzorky byly použity pro tuto studii, předem podepsali dobrovolně informovaný souhlas s použitím odebrané tkáně na výzkumné účely.

Do studie byli zařazeni pacienti, kteří v období mezi únorem roku 2016 a srpnem 2019 podstoupili anatomickou plicní resekci (lobektomie, bilobektomie, pneumonektomie) pro předem histologicky verifikovaný nemalobuněčný karcinom plic. Definitivní indikace k chirurgickému výkonu byla vždy individuálně konzultována na půdě multidisciplinárního týmu v rámci Pneumo-onkochirurgického centra Fakultní nemocnice Motol (Centrum vysoce specializované pneumoonkochirurgické péče), na kterém je kromě atestovaného hrudního chirurga přítomen pneumolog/onkopneumolog, onkolog, lékař specialista v oboru zobrazovacích metod, radioterapeut z příslušných kooperujících pracovišť Fakultní nemocnice Motol. Od pacientů byly v dostupných případech získány anamnestické údaje o kouření cigaret (aktivním či v minulosti). Histopatologická diagnostika probíhala v rámci náležité klinické praxe atestovanými patologií podle platné TNM klasifikace zhoubných nádorů. Výsledky patologického závěru pak byly zaznamenány.

3.2.2 Odebírané vzorky

V průběhu plicní operace ve fázi, kdy byla dokončena anatomická plicní resekce, byl chirurgický resekát (plicní lalok v případě lobektomie/laloky v případě bilobektomie /plicní křídlo v případě pneumonektomie) nativně bez prodlení transportován na peroperační vyšetřovnu Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol. Zde byly odebrány vzorky potřebné pro tento výzkum ve spolupráci s patologem, čímž bylo zajištěno, že odběr vzorků do této studie nebude interferovat s dostatečným množstvím nádorové tkáně potřebným k bezpečnému stanovení přesné definitivní patologické diagnózy.

Z každého resekátu bylo získáno celkem 6 samostatných vzorků následovně:

A. Vzorek tumoru o velikosti 5 x 5 mm³, ten byl pak dále rozdělen na tři části:

1. Část byla uložena do Trizolu (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), v kterém byla ponechána za pokojové teploty 4–5 minut. Následně byl tento vzorek uložen do hlubokého mrazícího boxu (- 80 °C).
 2. Zbývající dvě částky byly uloženy do prázdné zkumavky a zamražena v hlubokém mrazícím boxu (- 80 °C).
- B. Vzorek zdravé plicní tkáně velikosti 5 x 5 mm³ z makroskopicky nádorem nepostižené oblasti plicního parenchymu ve vzdálenosti minimálně nad 15 cm od tumoru. Tento vzorek byl rozdělen a zpracován zcela identickým způsobem, jako je uvedeno v předchozím bodu A.

3.2.3 Analytická fáze

Analytická a experimentální část výzkumu probíhala v prostorech Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Dále jsou uvedeny pouze další metody molekulární biologie, které byly použity v této experimentální části a nebyly použity v předchozí části práce. Metody včetně statistických použité v této části práce, které byly uvedeny v předchozí kapitole již na tomto místě znovu uvedeny nebudou.

3.2.4 Real-time PCR

Veškerá RNA byla izolována pomocí TRIZOLu (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Při použití této metody bylo postupováno v souladu s pokyny a instrukcemi výrobce. Celková RNA byla reverzně transkribována pomocí reverzní transkriptázy Super Script II reverse transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Kvantitativní PCR (qPCR) bylo provedeno pomocí Taqman system QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen, Hilden, Německo) na systému ViiA7 Real-Time PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) podle instrukcí výrobce. Pokus byl opakován dvakrát s obdobným výsledkem. Jako kontrola byl použit aktin.

4. Výsledky

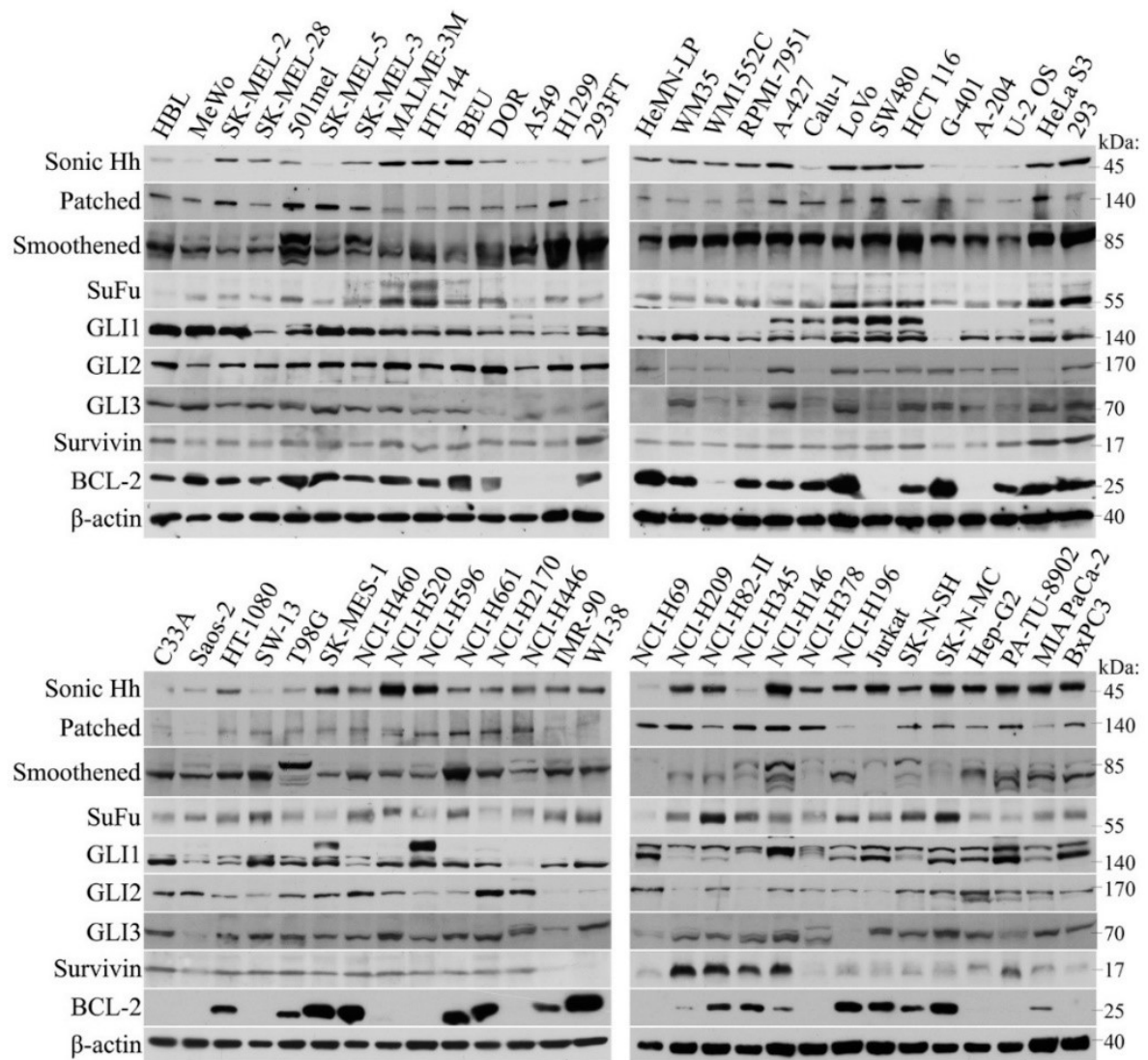
4.1 Studium signální dráhy Hedgehog

4.1.1 Exprese komponent a vybraných transkripčních cílů signální dráhy Hedgehog v panelu různých typů nádorových buněk.

V této části práce byla zkoumána exprese jednotlivých komponent signální dráhy Hedgehog v buněčných liniích nemalobuněčného karcinomu plic a některých dalších buněčných liniích různých nádorových typů. Celkově byl proveden screening velkého počtu nádorových buněčných linií pomocí Western blotů s protilátkami proti všem složkám signální dráhy Hedgehog. Výsledky jsou podrobně zobrazeny v **Obrázku 3**. Tímto experimentem bylo prokázáno, že jednotlivé komponenty signální dráhy Hedgehog (ligand sonic Hedgehog, receptor Patched, protein Smoothened, protein SUFU a transkripční faktory GLI1, GLI2, GLI3) jsou exprimovány v podstatě u všech zkoumaných typů buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic. Byly analyzovány také buněčné linie malobuněčného karcinomu plic, kde byla situace obdobná jako u nemalobuněčného karcinomu plic. U buněčných linií ostatních nádorových typů byla exprese komponent dráhy Hedgehog taktéž zaznamenána, pouze výjimečně byla exprese u některých proteinů signální dráhy nižší. V některých typech buněčných linií bylo například přítomno velmi málo transkripčního faktoru GLI2 nebo GLI3. V některých případech se velmi lišila exprese dvou hlavních transkripčních aktivátorů GLI1 a GLI2: například dvě buněčné linie (G-401 a NCI H446) exprimovaly v zanedbatelné míře transkripční faktor GLI1, zatímco GLI2 exprese v nich byla vysoká. Transkripční faktor GLI2 (ale nikoli GLI1) byl také vysoce exprimován v některých dalších buněčných liniích (RPMI-7951, Calu-1, HeLa S3, H-209, H-345, a Jurkat). Hladina proteinu SUFU byla nízká u linií Hbl a H69. Exprese receptoru Patched byla nízká u buněčné linie Saos-2 a Jurkat. Exprese proteinu SMO byla nízká u H69 buněk (malobuněčný karcinom plic). Zajímavým zjištěním v tomto experimentu rovněž bylo, že exprese samotného ligandu sonic Hedgehog se velmi lišila u jednotlivých nádorů.

Dále byla zkoumána exprese dvou vybraných transkripčních cílů signální dráhy Hedgehog. Prvním byl gen pro protein survivin, který má za fyziologických okolností antiapoptotickou funkci (dříve také nazýván „nádorový protein“) a jeho spojitost se signální dráhou Hedgehog u nádorů byla objevena teprve nedávno (Vlckova K. et al. 2016). Druhým byl protein bcl-2, který má taktéž antiapoptotickou funkci a byl již dříve popsán jako transkripční cíl signální dráhy Hedgehog u některých typů nádorů. Zatímco survivin byl

aktivován prakticky ve všech zkoumaných nádorových buňkách, exprese rovněž silně antiapoptotického proteinu bcl-2 někde úplně chyběla. U kontrolních nenádorových linií lidských normálních diploidních fibroblastů (IMR-90 a WI-38) bylo exprimováno jen velmi malé množství survivinu, což dokazuje specifitu jeho exprese v rychle se dělících nádorových buňkách. Jako kontrola exprese a integrity vzorků byl použit β -aktin (**Obrázek 3**).



Obrázek 3. Panel proteinové exprese jednotlivých komponent signální dráhy Hedgehog.

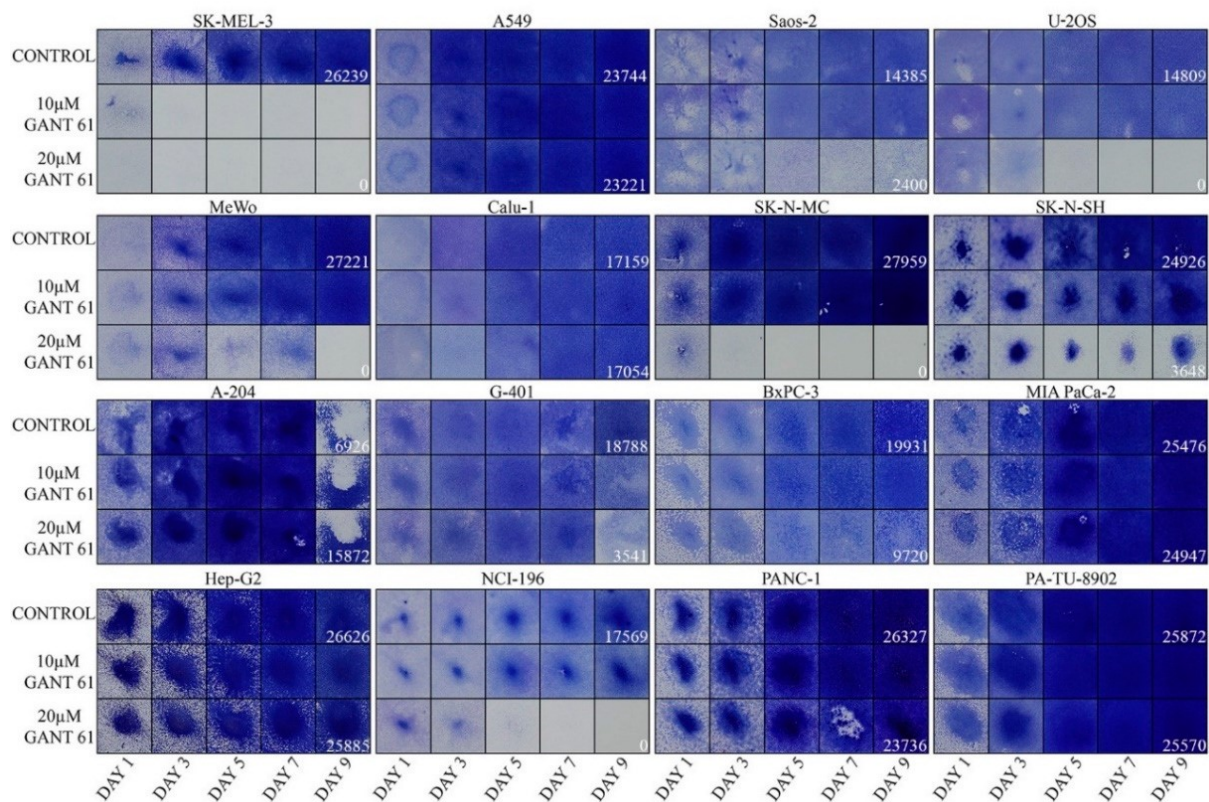
Western bloty byly provedeny po elektroforéze 30 μ g (RIPA-extrakt) proteinu a próbovány specifickými protilátkami. Velikost proteinů je ukázána vpravo v kD.

4.1.2 Inhibice buněčné proliferace pomocí GANT61 (inhibitor transkripčního faktoru GLI)

Dále byla testována senzitivita vůči GLI-specifickému inhibitoru GANT61, který inhibuje vazbu GLI faktorů na DNA, a tím znemožňuje jeho transkripčně-aktivační funkci. Toto bylo provedeno na panelu 16 typů buněčných linií (nemalobuněčný i malobuněčný karcinom plic a pro srovnání některé ostatní typy nádorů). Mezi další nádorové typy patřily kromě uvedených dvou typů plicního karcinomu také melanom, osteosarkom, neuroblastom, rhabdoidní nádor a karcinom jater nebo pankreatu. Výsledky jsou zobrazeny na **Obrázku 4**.

Bylo zjištěno, že zkoumané vybrané linie nemalobuněčného karcinomu plic (A549 a Calu-1) ale také buněčná linie rhabdoidního tumoru (A-204), buněčné linie hepatocelulárního karcinomu (Hep-G2) a tři buněčné linie karcinomu pankreatu (MIA PaCa-2, PANC-1, a PATU-8902) nebyly na konci experimentu (9. den kultivace) k působení inhibitoru GANT61 senzitivní. Nicméně, i tyto buněčné linie za přítomnosti inhibitoru GANT61 nakonec podlehly apoptóze, ale později (zhruba 12. den kultivace, což již není zobrazeno).

Naopak, některé typy buněk se ukázaly jako velmi senzitivní a byly kompletně eradikovány na konci experimentu (9. den kultivace), jednalo se například o linie maligního melanomu (SK-MEL-3, MeWo), osteosarkomu (U-2 OS), neuroblastomu (SK-N-MC) a malobuněčného karcinomu plic (H196). Další skupina nádorů byla inhibitory eradikována částečně, například další buněčná linie osteosarkomu (Saos-2), neuroblastomu (SK-N-SH), rhabdoidního tumoru (G-401) a jedna buněčná linie karcinomu pankreatu (BxPC-3).

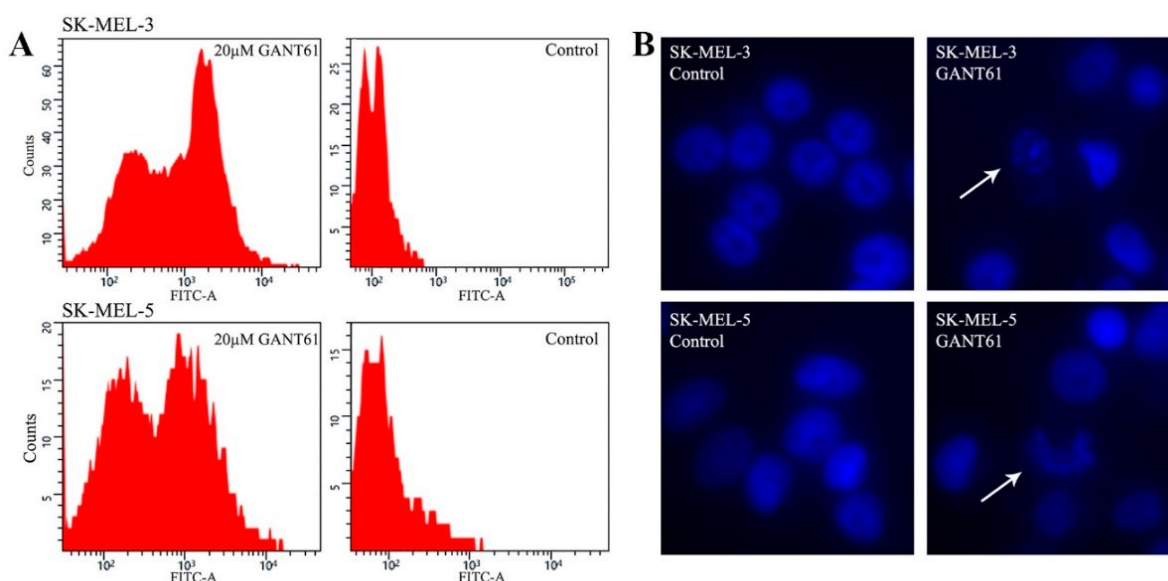


Obrázek 4. Analýza sensitivity proliferace nádorových buněčných linií na inhibitor *GLI* *GANT61*. Intenzita barvení krystal violetí představuje relativní množství zbývajících buněk a u každé buněčné linie je vždy ukázána kontrola bez inhibitoru. Koncentrace *GANT61* byla vždy 20µM a kvantifikace zbývajících přežívajících buněk je ukázána jen v poslední 9. den pokusu. Experimenty byly prováděny pouze do 9. dne proto, že kontrolní (neinhibované) nádorové buňky přežívaly, rychle proliferovaly a začaly se odlupovat nespecificky jako následek postkonfluentního růstu. Experimenty byly provedeny každý nejméně 2x se zcela obdobnými výsledky a byly provedeny na 12-jamkových kultivačních platíčkách.

K objasnění, jakým mechanismem *GANT61* eradikuje výše uvedené senzitivní nádorové buňky, byla použita tzv. TUNEL assay, a to pomocí průtokové cytometrie. TUNEL assay je metoda, kterou se velmi specificky a s velkou senzitivitou určuje, zda buňky podléhají po přidání určité látky apoptóze. Analýza byla provedena v celé řadě buněčných linií, včetně linií nemalobuněčného karcinomu plic. Výsledky jsou patrné na **Obrázku 5**, na kterém jsou sice pro větší ilustrativnost metody ukázány dvě buněčné linie lidského melanomu (SK-ML-3 a SK-MEL-5), ale všechny testované linie, které po inhibici pomocí *GANT61* podléhaly apoptóze stejným způsobem (na **Obrázku 5 v části A** je v levém panelu patrný druhý peak více vpravo). Změny v buněčném cyklu nebyly detekovány (není

ukázáno). V kontrolních buňkách, do kterých GANT61 nebyl přidán, se apoptóza neprojevila.

Na podporu výsledků průtokové cytometrie byly provedeny rovněž mikroskopické studie, kdy je detekována apoptóza pomocí barvení DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), což je barvivo s modrou fluorescencí, díky němuž lze identifikovat typické apoptotické obrazce indikující rozpad DNA (již většího rozsahu) při apoptóze. Výsledky jsou prezentovány na **Obrázku 5, v části B**. Podobné obrazce se objevovaly i v jiných typech buněk včetně nemalobuněčného karcinomu plic. Typickými nálezy jsou fragmentovaná pyknotická jádra nebo větší rozpad celých buněčných jader. Právě tyto obrazy byly zjištěny i v našich pokusech u některých buněčných jader. Důvod, proč byl tento nález zjištěn pouze u některých buněčných jader je dán rozdílnou citlivostí obou použitých metod. TUNEL assay je totiž mnohem citlivější a odhaluje již počáteční (mikroskopicky ještě nedetekovatelná) stádia fragmentace DNA.

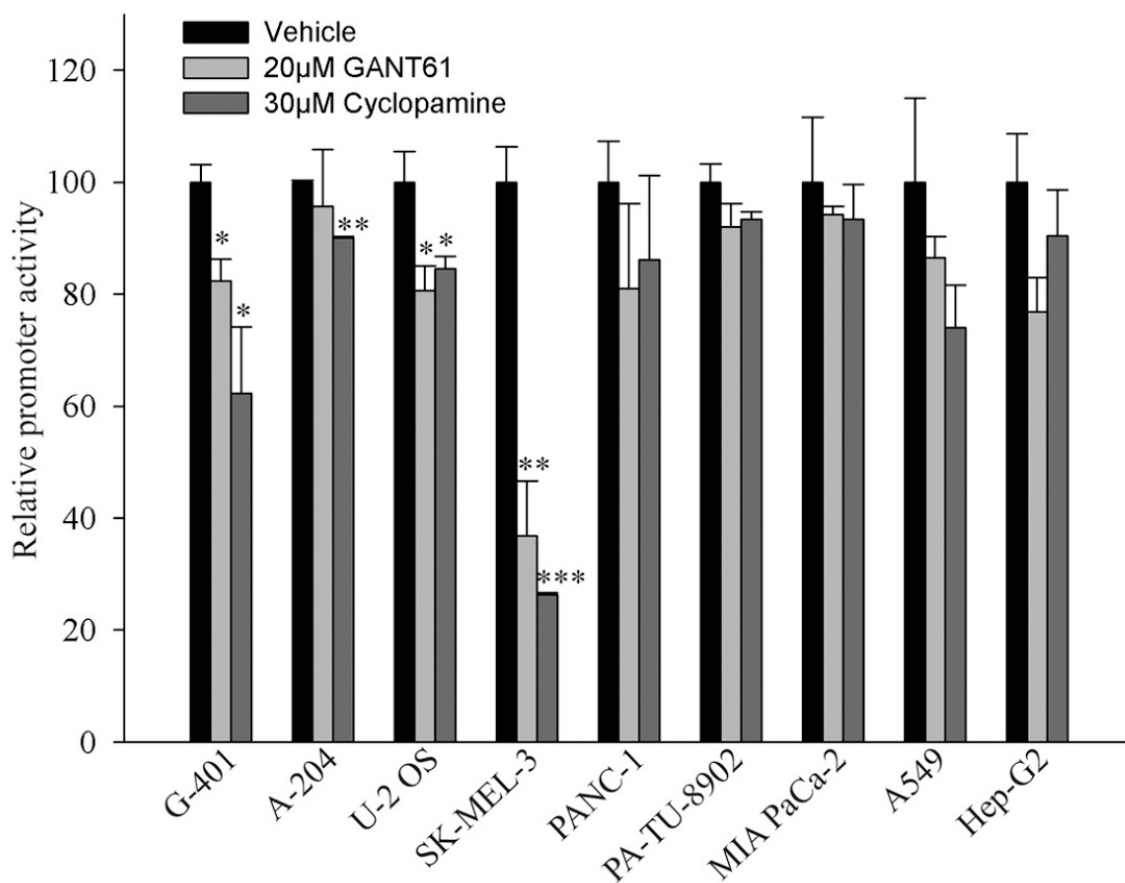


Obrázek 5. (A) Metoda “TUNEL assay” detekující časné fáze apoptotického procesu (fragmentace DNA). Metoda byla provedena na více buněčných liniích včetně nemalobuněčného karcinomu plic (v této linii však došlo k apoptóze až později než 9. den experimentu), pro názornost jsou však ukázány jen dvě buněčné linie (melanom), na kterých je apoptóza nejvíce zřetelná. K buňkám byl přidán inhibitor GANT61 v koncentraci 20 μM a buňky byly sklizeny a analyzovány o 24 hodin později. Protože se některé buňky vlivem apoptózy odlupovaly od povrchu, odloupané i přisedlé buňky byly spojeny, promyty v PBS a analyzovány pomocí TUNEL metody na průtokovém cytometru BriCyte EA (Mindray, Shenzhen, Čína). Kvantifikace ukázala u buněk SK-MEL-3 63 % apoptotických buněk a 37 % neapoptotických), naopak kontrola (bez GANT61) měla jen 0,4 % apoptotických buněk a 99,6 % neapoptotických buněk. SK-MEL-5 buňky s GANT61 měly 52 % buněk apoptotických a 48 % neapoptotických, zatímco kontrola bez GANT61 4 % apoptotických buněk a 96 % neapoptotických. Kvantifikace byla provedena pomocí ImageJ software software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

(B) Fluorescence pomocí barvení na DNA (DAPI, 4',6-diamidino-2-fenylindol, který barví DNA modře) rovněž ukazuje masivní apoptózu u některých buněk. Pozdní fáze apoptózy je spojena s výraznou fragmentací DNA a mikroskopicky lze prokázat atypická buněčná jádra (pyknotická jádra, fragmentovaná nebo úplně rozpadlá jádra).

4.1.3 Aktivita promoteru reagujícího na aktivitu GLI faktorů.

Pro zjištění, jak jsou GLI-aktivované promotery inhibovány pomocí inhibitorů Hedghog dráhy GANT61 a cyclopaminu, byl použit jako modelový reporter-promoter pro GLI promoter obsahující 12 konsensních míst pro vazbu GLI faktorů (**Obrázek 6**). Byla provedena transfekce tohoto 12xGLI-luciferase-reporter a referenčního plazmidu do buněčných linií různých nádorových typů. Různé typy buněk se ukázaly jako rozdílně citlivé na oba typy inhibitorů. Obecně lze konstatovat, že testované buňky byly poměrně málo citlivé a aktivita faktoru GLI2 se zmenšovala jen málo. Tak tomu bylo i u buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic (A549). Nejvíce citlivé byly buňky maligního melanomu v buněčné linii SK-MEL-3, což koreluje s jeho vysokou schopností podléhat apoptóze. U některých nádorových linií byly odchylky po přidání inhibitorů statisticky nesignifikantní. Podobné výsledky byly získány i u dalšího GLI-responsivního reporteru pro Patched (výsledky nejsou ukázány). Nicméně výsledky tohoto pokusu ukazují na obecnou korelaci inhibice GLI2 a inhibici buněčné proliferace (viz. **Obrázek 4**).



Obrázek 6. Látky GANT61 a cyclopamin redukovaly 12xGLI reporter aktivitu v lidských nádorových liniích. Zmenšení aktivity bylo většinou malé. Reakce byla provedena na 12-jamkových destičkách a Renilla luciferase plasmid byl použit pro korekci transfekční účinnosti. Experiment bylo opakován 2x se stejnými výsledky, v triplicátech. Data jsou prezentována jako průměr se směrodatnou odchylkou. Černé sloupečky jsou kontroly (jsou bez značky). Sloupečky se značkou znamenají statistickou signifikanci, statistická významnost je: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.2 Studium proteinu SIVA-1

4.2.1 Demografická a klinicko-patologická charakteristika souboru pacientů

Do souboru byli zařazeno 39 pacientů, kteří v období mezi únorem roku 2016 a srpnem 2019 podstoupili anatomickou plicní resekci (lobektomie, bilobektomie, pneumonektomie) pro předem histologicky verifikovaný nemalobuněčný karcinom plic a podepsali informovaný souhlas. Průměrný věk pacientů v souboru byl 68,4 let (nejmladší 54 let, nejstarší 80 let). Poměr žen a mužů v tomto souboru byl přibližně vyrovnaný (48,7 % vs 51,3 %). Pozitivní anamnéza kouření cigaret (aktivní nebo v minulosti) byla prokazatelně dokumentovatelná u téměř 75 % pacientů v souboru. Pouze jeden pacient (2,6 %) před chirurgickým výkonem podstoupil neoadjuvantní onkologickou léčbu (konkomitantní chemoradioterapie).

Více tumorů bylo u pacientů v tomto souboru lokalizováno v pravé plicí (61,5 %). Nejčastějším typem anatomické plicní resekce byla nepřekvapivě lobektomie provedená v 32 případech (82 %), z toho se o horní lobektomii jednalo v 16 případech (50 % lobektomií), o dolní lobektomii ve 14 případech (43,8 % lobektomií) a střední lobektomie byla provedena ve 2 případech (6,2 % lobektomií). Zbývající výkony zahrnovaly 4 pneumonektomie pro centrálně uložený karcinom (10,3 %) a 3 bilobektomie (7,7 %), z nichž 2 byly horní a 1 dolní.

Definitivní histopatologické vyšetření prokázalo adenokarcinom v 18 případech (46,2 %), dlaždicobuněčný karcinom v 19 případech (48,7 %) a adenoskvamózní karcinom ve 2 případech (5,1 %). Stupeň diferenciaci (grade) těchto nádorů byl v 19 případech grade 2 (48,7 %) a v 19 případech grade 3 (48,7 %). V jednom případě pak stupeň diferenciaci nebylo možné určit kvůli regresivním změnám a výraznému úbytku viabilní nádorové tkáně po onkologické léčbě u jediného pacienta právě po neoadjuvantní chemoradioterapii (2,6 %). Nejčastěji zaznamenané klinické stádium nemalobuněčného karcinomu plic podle platné TNM klasifikace u tohoto souboru pacientů bylo stádium IIB (12 případů; 30,7 %). Následovalo stádium IA zachycené v 8 případech (20,5 %) a stádium IIA v 7 případech (18 %). Stádia IB a IIIA byla zachycena každé v 5 případech (12,8 %). Pokročilejší stádia IIIB a IIIC byla zaznamenána každé v 1 případě (2,6 %).

Charakteristika pacientů (počet=39)	
Průměrný věk, roky (směrodatná odchylka)	68.4 (6.3)
Pohlaví, počet (%)	
ženy	19 (48.7%)
muži	20 (51.3%)
Anamnéza kouření cigaret, počet (%)	
ne	3 (7.7%)
ano	29 (74.4%)
neznámo	7 (17.9%)
Neoadjuvantní onkologická terapie, počet (%)	
ano	1 (2.6%)
ne	38 (97.4%)
Typ operačního výkonu, počet (%)	
strana	
pravá	24 (61.5%)
levá	15 (38.5%)
rozsah anatomické resekce	
lobektomie	32 (82%)
bilobektomie	3 (7.7%)
pneumonektomie	4 (10.3%)
typ lobektomie	
horní	16 (50%)
střední	2 (6.2%)
dolní	14 (43.8%)
typ pravostranné bilobektomie	
horní	2 (67%)
dolní	1 (33%)
Histologie, počet (%)	
adenokarcinom	18 (46.2%)
dlaždicobuněčný karcinom	19 (48.7%)
adenoskvamózní karcinom	2 (5.1%)
Grade, počet (%)	
neurčen pro regresi po léčbě	1 (2.6%)
1	0
2	19 (48.7%)
3	19 (48.7%)
Stádium dle TNM, počet (%)	
IA	8 (20.5%)
IB	5 (12.8%)
IIA	7 (18%)
IIB	12 (30.7%)
IIIA	5 (12.8%)
IIIB	1 (2.6%)
IIIC	1 (2.6%)

Tabulka 1. Demografická a klinicko-patologická charakteristika souboru pacientů.

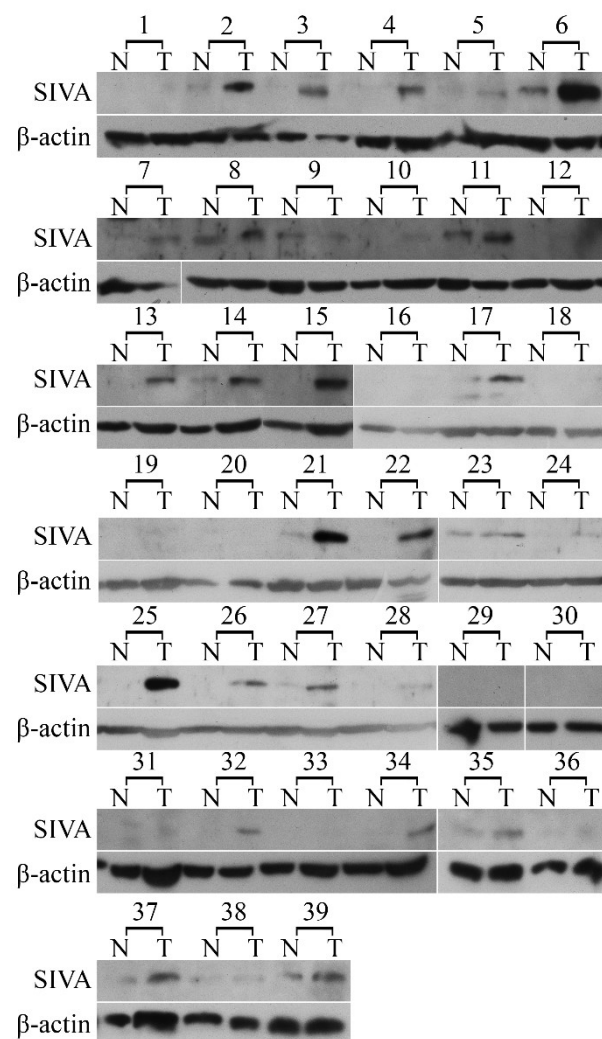
4.2.2 Hladiny proteinu Siva-1 v nádorové a normální plicní tkáni stanovené pomocí Western blotu

Bylo analyzováno 39 lidských vzorků nemalobuněčného karcinomu plic a stejný počet vzorků nádorem nepostiženého plicního parenchymu vždy od stejného pacienta, které sloužily jako kontroly. Použitou metodou byl Western blot nádorových a kontrolních extraktů. Výsledky jsou patrné na **Obrázku 7**. Jak bylo uvedeno výše, kromě jediného vzorku (na obrázku číslo 23), kde u pacienta proběhla neoadjuvantní chemoradioterapie, byly všechny resekované vzorky od pacientů bez předchozí onkologické léčby.

Hladina proteinu SIVA-1 byla v podstatě vždy vyšší v nádorové tkáni, jen v některých párech vzorků byla stejná i u kontroly. Několik vzorků nádorů mělo hladinu SIVA-1 nedetekovatelnou (vzorky 16, 20, 29, 30, 33), i když zde mohla být přítomna nízká, ale pod úrovní detekce protilátkou. V těchto vzorcích pak nebyl protein detekovatelný ani v normální zdravé plicní tkáni. Některé vzorky nemalobuněčného plicního karcinomu měly oproti kontrolám extrémně vysokou hladinu SIVA-1 (vzorky 2, 6, 15, 21, 37). Vzorek 23 získaný od jediného pacienta, který absolvoval před operací neoadjuvantní chemoradioterapii, měl hladinu proteinu přibližně stejnou v nádoru i kontrole. Vzhledem k ostatním výsledkům, kdy protein byl téměř vždy zvýšen v nádorové tkáni, lze (zatím zcela hypoteticky) říct, že hladina proteinu SIVA-1 v nádoru se mohla po neoadjuvantní chemoradioterapii snížit. Hladiny proteinu SIVA-1 nijak nekorelovaly s klinickými daty jako například věk, pohlaví, kouření, histopatologická diagnóza, grade nebo stádium.

Celkově lze tedy říct, že hladina proteinu SIVA-1 byla obecně zvýšena (někdy extrémně silně) v nádorové tkáni. Na druhé straně však existuje malé procento tumorů, jejichž hladina je velmi nízká a není protilátkou detekována. Nikdy však kontroly nevykázaly větší expresi než nádory. To vše může svědčit jednak pro důležitost SIVA-1 při progresi nádoru (vysoké hladiny), jednak pro důležitost proteinu při iniciaci nádoru (nízké hodnoty), kdy při progresi není již studovaný protein tak důležitý. Z původní práce citované v úvodu nevyplývá, zda SIVA-1 u myších nádorů hra roli při iniciaci nebo progresi. Výsledky v podstatě korelují se stanovením hladiny proteinu v buňkách buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic i dalších nádorů, kdy hladina SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic i dalších nádorových typů byla někde velmi vysoká, někde střední, výjimečně chyběla (viz dále). V každém případě však naše výsledky ukazují na obecně zvýšenou expresi SIVA-1 ve zkoumaných vzorcích nemalobuněčného karcinomu plic a podporují tak

hypotézu, že má tento protein onkogenní funkci nejen u myšího modelu nemalobuněčného karcinomu plic ale i lidského nemalobuněčného karcinomu plic.

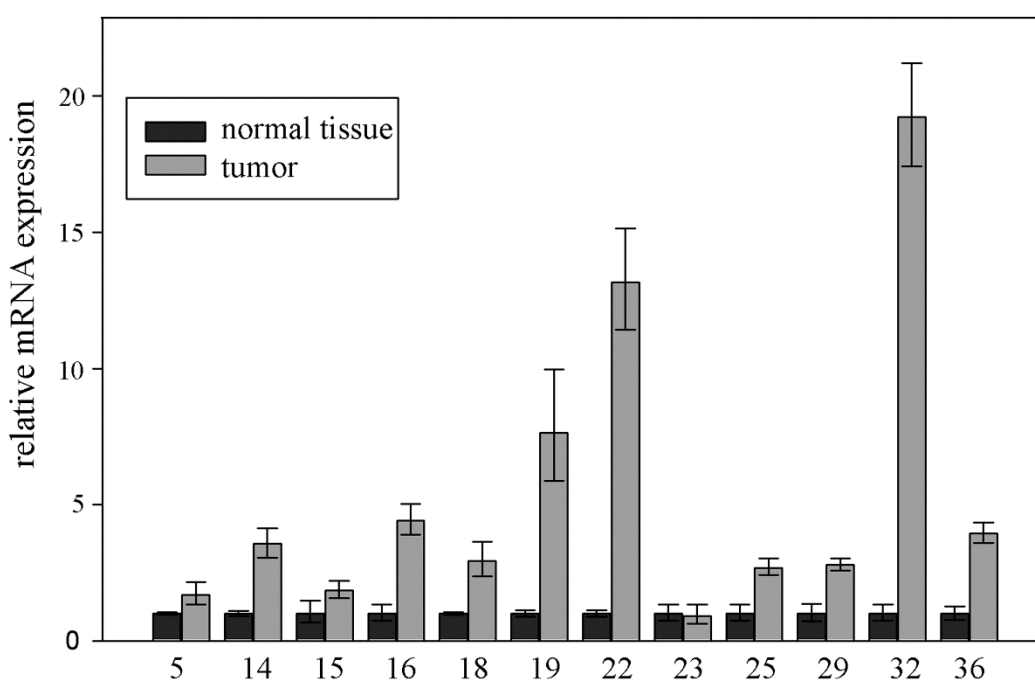


Obrázek 7. Hladiny proteinu Siva-1 v nádorové a normální plicní tkáni.

N: normální plicní parenchym, T: tumor. Jako referenční protein a indikátor integrity vzorku by použit β -aktin. Všechny resekované vzorky po izolaci extraktu ukázaly extrakt kvalitní, použitelný pro Western blot. Velikost zkoumaného proteinu je malá, pod 20 kD.

4.2.3 Stanovení hladiny SIVA-1 mRNA v nádorové a normální plicní tkáni pomocí real-time PCR

Ke zjištění, zda zvýšení přítomnosti proteinu SIVA-1 v nádorové tkáni změřené na Western blotech je způsobeno zvýšenou transkripcí, byla izolována z nádorových i kontrolních vzorků RNA a po reverzní transkripci měřena hladina cDNA pomocí real-time PCR. Použita byla jsmo přesnější a specifitější metoda Taqman. Výsledky jsou zobrazeny na **Obrázku 8**. V některých vzorcích byla však RNA degradována a pro metodu takový vzorek nebylo možno použít. Nicméně, ve všech analyzovaných vzorcích byla RNA vždy zvýšena v nádorové tkáni oproti kontrole, což svědčí o transkripci jako o procesu, který výrazně ovlivňuje hladinu proteinu SIVA-1 v nádorové tkáni vůči kontrole. Pouze vzorek 23 získaný od jediného pacienta, který absolvoval před operací neoadjuvantní chemoradioterapii, měl hladinu RNA přibližně stejnou v nádoru i kontrole. Obecně zvýšení hladiny nekorelovalo s vyšší hladinou proteinu (kapitola 4.2.2 a **Obrázek 7**). Zvýšení specifické RNA vůči kontrole se v analyzovaných vzorcích výrazně lišilo, všude však bylo statisticky signifikantní.



Obrázek 8. Analýza exprese SIVA-1 mRNA pomocí Taqman systému metodou real-time PCR. Zvýšení ve všech nádorových vzorcích (kromě vzorku 23) oproti kontrolám je jasně zřetelné, i když variabilita zvýšení byla široká (od dvojnásobku až po dvacetinásobek).

4.2.4 Srovnání hladiny proteinu SIVA-1 v odebraných vzorcích a ve vybraných liniích buněčných kultur nemalobuněčného karcinomu plic

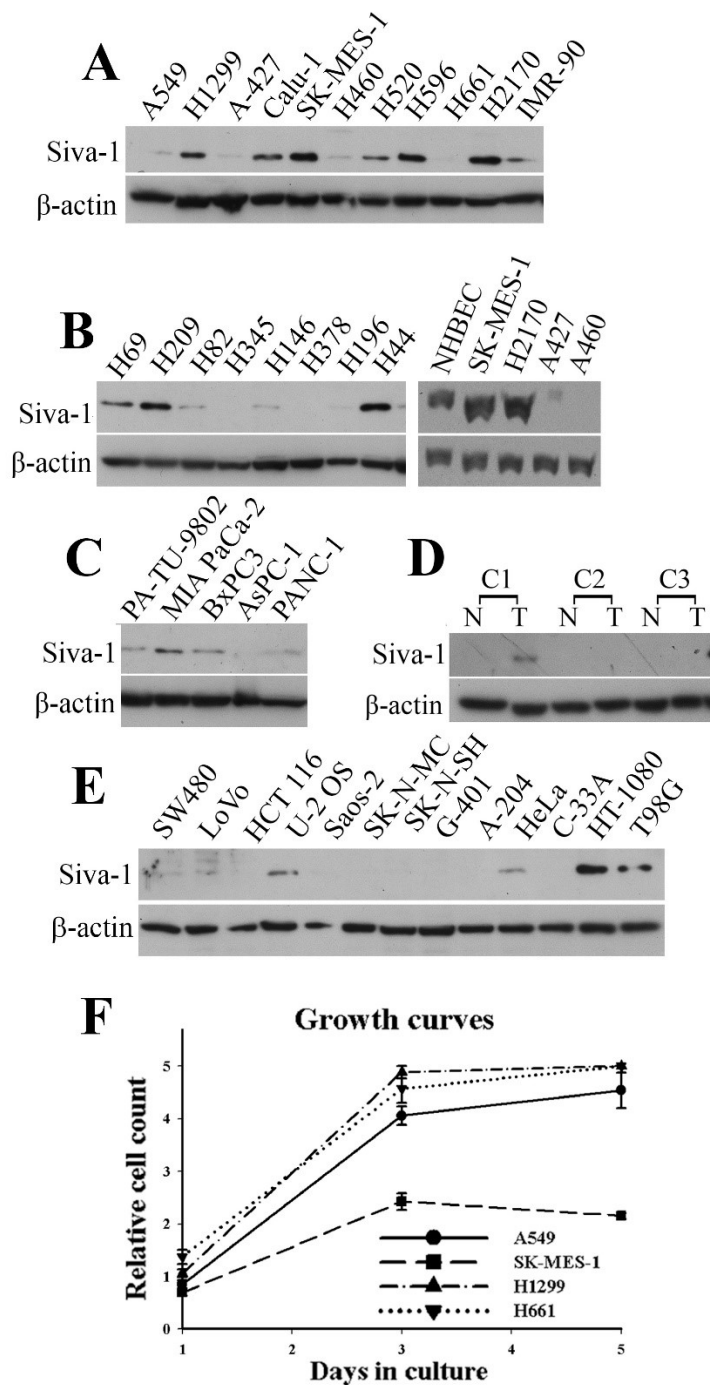
Pro srovnání hladiny proteinu SIVA-1 v nádorové tkáni získané od souboru pacientů a ve vybraných buněčných liniích nemalobuněčného karcinomu plic z buněčných kultur (i několika jiných typů nádorů) byl použit opět Western blot. Výsledky jsou zobrazeny na **Obrázku 9**.

Zjištěná hladina proteinu SIVA-1 se opět velmi lišila napříč jednotlivými typy nádorových buněčných linií (**Obrázek 9, část A**). Velmi vysoká hladina proteinu SIVA-1 byla detekována u některých buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic (H1299, H2170 nebo SK-MES-1) zatímco u jiných buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic byla exprese velmi nízká (A549 a H460) nebo nebyla vůbec detekovatelná (linie H661). Pro srovnání je ukázána i exprese proteinu SIVA-1 v normálních lidských fibroblastech (IMR90).

Dále byla zkoumána míra exprese i v buněčných liniích lidského malobuněčného karcinomu plic (**Obrázek 9, část B, levý panel**). V těchto buněčných liniích byla situace podobná jako u linií nemalobuněčného karcinomu plic s rozdílem, že zde bylo více linií s nízkou nebo žádnou expresí proteinu SIVA-1. Naopak vysoká hladina tohoto proteinu byla zaznamenána u linií H209 nebo H44. Podstatným zjištěním je, že v buněčných liniích kultivovaných buněk normálního bronchiálního epitelu (NHBE) byla exprese proteinu SIVA-1 poměrně vysoká, což by mohlo značit možnou úlohu tohoto proteinu při karcinogenezi lidských plicních nádorů (**Obrázek 9, část B, pravý panel**). Absence exprese proteinu SIVA-1 v normálních epitelálních bronchiálních buňkách by totiž vylučovala hypotézu, že přítomnost tohoto proteinu je nutná pro vývoj nemalobuněčného karcinomu plic u myši (Van Nostrand J. L. et al., 2015).

Pro další srovnání exprese proteinu SIVA-1 byly použity extrakty z jiných linií nádorových buněk než plicních. Například u buněčných linií karcinomu pankreatu byla hladina proteinu SIVA-1 obecně nižší než v buňkách nemalobuněčného karcinomu plic (**Obrázek 9, část C**). I u dalších různých typů buněčných nádorových linií byla obecně exprese proteinu SIVA-1 velmi nízká až žádná, kromě fibrosarkomu (linie HT1080) (**Obrázek 9, část E**). Jako další srovnání k analyzovaným resekovaným vzorkům nemalobuněčného karcinomu plic byla provedena analýza tří kolorektálních karcinomů a příslušných kontrol. Zde byl protein SIVA-1 přítomen jen u jednoho ze tří kolorektálních karcinomů, a to navíc v poměrně nízké hladině (**Obrázek 9, část D**).

Bylo také zkoumáno, zda inherentní přítomnost proteinu SIVA-1 v buňkách lidského nemalobuněčného karcinomu plic v buněčné kultuře přináší buňkám proliferační výhodu. Byl analyzován růst dvou buněčných linií lidského nemalobuněčného karcinomu plic s nízkou nebo žádnou hladinou proteinu SIVA-1 (linie A427 a H661) a dvou buněčných linií lidského nemalobuněčného karcinomu plic s vysokou hladinou proteinu SIVA-1 (linie H1299 a SK-MES-1). Výsledky jsou uvedeny na **Obrázku 9 (část E)**. Nebyla nalezena žádná korelace mezi hladinou proteinu SIVA-1 a rychlostí proliferace. Buněčná linie SK-MES-1 s vysokou hladinou proteinu SIVA-1 proliferovaly výrazně pomaleji a tři ostatní testované buněčné linie proliferovaly přibližně stejně rychle.



Obrázek 9. Expresse proteinu Siva-1 v buňkách buněčných kultur a růstové křivky buněčných kultur s nízkou a vysokou hladinou proteinu. (A) Expresse proteinu SIVA-1 u lidských nemalobuněčných karcinomů plic a kontrolních fibroblastů. (B) Hladina proteinu u lidských malobuněčných karcinomů plic a u normálních bronchiálních epiteliálních buněk. (C) Hladina proteinu u 5 pankreatických nádorů (pro srovnání). (D) Hladina proteinu u tří

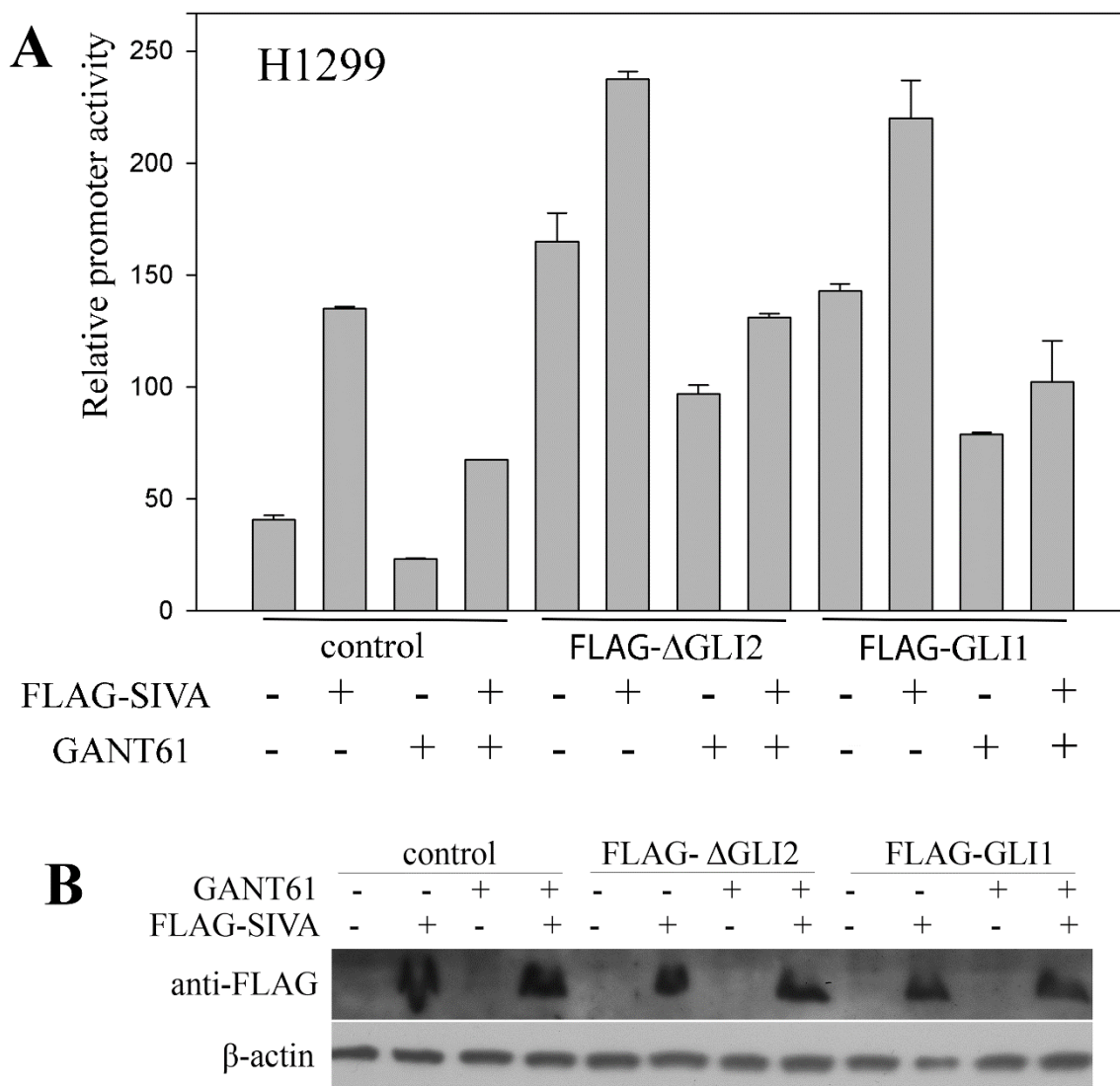
kolorektálních karcinomů a jejich kontrolních tkání (pro srovnání). **(E)** Hladina proteinu u dalších různých typů nádorových buněk. **(F)** Proliferační křivky u 2 buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic s nízkou až žádnou hladinou SIVA-1 a u 2 linií s vysokou hladinou. Proliferace byla provedena v jamkách na destičkách, buňky obarveny krystal violetí, odbarveny a kvantifikovány.

4.2.5 Vztah proteinu SIVA-1 a signální dráhy Hedgehog

V další části práce bylo zkoumáno, jakým mechanismem (kromě například již popsané aktivace mTOR dráhy) by mohl být protein SIVA-1 onkogenní. Jeden z transkripčních cílů signální dráhy Hedgehog je gen kódující antiapoptotický protein survivin. Z tohoto důvodu byl použit survivin promoter-reporter systém ke zjištění, zda je protein SIVA-1 schopen také aktivovat promoter jinak aktivovaný signální dráhou Hedgehog. K tomuto experimentu byla použita speciálně připravená forma proteinu SIVA-1 (N-terminální FLAG-SIVA-1), která je stejně účinná jako nativní forma. Výsledky jsou patrné na **Obrázku 10, část A**. Na základě tohoto experimentu je zřejmé, že konstrukt FLAG-SIVA-1 aktivoval promoter pro survivin, a to jednak bez přidání transkripčních faktorů GLI (první čtveřice vzorků), jednak i s přidáním transkripčního faktoru GLI1 nebo GLI2 (u GLI2 byla použita forma ΔGLI2, ve které je odstraněna N-terminální represorová doména a tato forma se běžně používá jako GLI2 transkripční aktivátor). FLAG-SIVA-1 aktivoval i GLI2-aktivovaný promoter (druhá čtveřice vzorků) a rovněž GLI1-aktivovaný promoter, i když zde o něco méně (třetí čtveřice vzorků). Konstrukt FLAG-SIVA-1 byl velmi účinný, neboť jeho aktivační funkce bez přidání transkripčních faktorů GLI byla ještě o něco větší než aktivace s GLI2 faktorem. Mimo to, FLAG-SIVA-1 v případě přítomnosti transkripčního faktoru GLI2 ještě zvýšil GLI2-aktivovanou transkripci.

Ve všech případech FLAG-SIVA-1 antagonizoval inhibici dráhy Hedgehog navozenou jejím inhibítorem GANT61, a to opět nejvíce ve vzorcích, kdy nebyly přidány transkripční faktory GLI1 nebo GLI2 (**Obrázek 10, část A**). Exprese FLAG-SIVA-1 byla ve všech případech stejná, což bylo prokázáno pomocí anti-FLAG protilátky (**Obrázek 10, část B**). K aktivaci byly použity i FLAG-formy GLI1 a GLI2, nicméně na kontrolním Western blotu jde však jasně o expresi FLAG-SIVA-1, neboť rozdíl molekulové hmotnosti GLI faktorů a SIVA-1 je velký (GLI faktory jsou větší než 160 kD, SIVA-1 menší než 20 kD). Tento experiment byl následně proveden také na dvou jiných typech nádorových buněčných linií než plicních, kde aktivace signální dráhy Hedgehog a survivinového promoteru

proteinem SIVA-1 byla marginální nebo vůbec žádná (není ukázáno). Tímto experimentem tak bylo dokázáno zcela originální pozorování, že protein SIVA-1 aktivuje signální dráhu Hedgehog u buněk lidského nemalobuněčného karcinomu plic a má zde tedy tkáňově specifickou onkogenní funkci, což je zcela opačná funkce než u jiných buněčných typů.



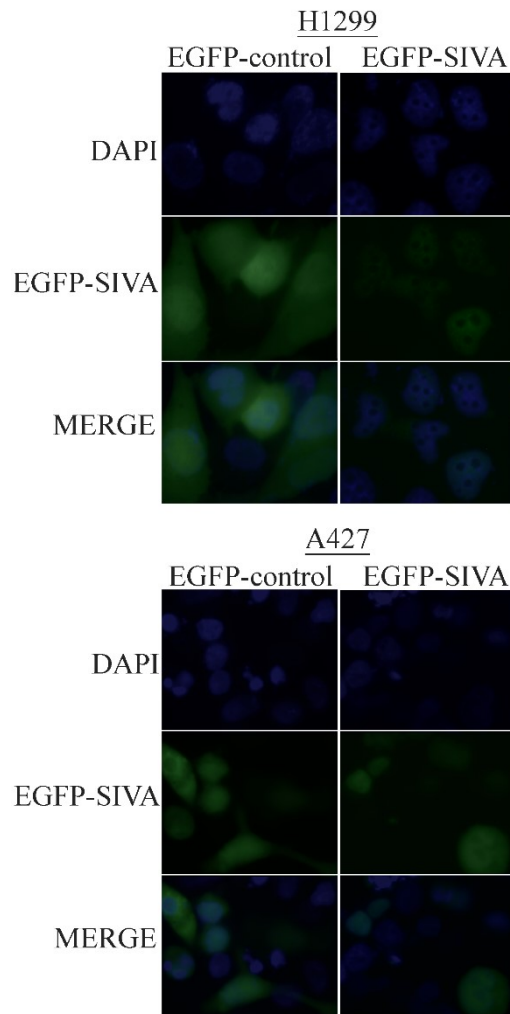
Obrázek 10. SIVA-1 aktivuje Hedgehog dráhu a GLI faktory. Promoter-reportérový systém pro survivinový promotor byl použit jako indikátor aktivace Hedgehog dráhy u buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic (H1299). (A) Aktivace byla pozorována bez přítomnosti i s

ko-transfekcí GLI1 a GLI2 transkripčních faktorů. Pokus byl opakován 2x se stejnými výsledky. GANT61 byl přidán 20 hodin před konečným sklizením buněk a následnou přípravou buněčného extraktu. Všechny rozdíly v hodnotách aktivity promoteru jsou statisticky signifikantní. (B) Kontrolní Western blot ukazuje, že množství protein SIVA-1 bylo po transfekci FLAG-SIVA-1 plazmidu vždy stejné. Jako referenční plazmid byl použit plazmid pro Renilla luciferase.

4.2.6 Subcelulární lokalizace proteinu SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic

Překvapivé zjištění, že protein SIVA-1 má vliv na Hedgehog dráhou řízenou transkripci survivinového promoteru vedlo k dalším experimentům za účelem zjištění buněčné lokalizace proteinu SIVA-1. Ten by tak, pokud má transkripčně aktivační efekt na dráhu Hedgehog, by měl být lokalizován v buněčném jádru. Za tímto účelem byl připraven SIVA-EGFP (enhanced green fluorescent product) expresní konstrukt, který po transfekci exprimuje fúzní protein SIVA-EGFP, jenž poté svítí přímo zeleně (vlivem přítomnosti právě EGFP). Jako kontrolní konstrukt byl použit samostatný EGFP protein. Oba konstrukty byly transfektovány do dvou typů nádorových buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic (linie H1299 a A427).

Výsledky ukázaly, že zatímco kontrolní samostatný protein EGFP byl lokalizován v buněčném jádru i cytoplazmě, SIVA-EGFP se lokalizoval téměř výhradně do buněčného jádra. Výsledky byly podobné u obou testovaných buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic (**Obrázek 11**). Tento nález je v souladu s myšlenkou, že SIVA-1 má také dosud nepoznanou jadernou funkci, tedy podpora konečné transkripce signální dráhy Hedgehog, jak bylo originálně zjištěno na survivinovém promoteru (kapitola 4.2.5).



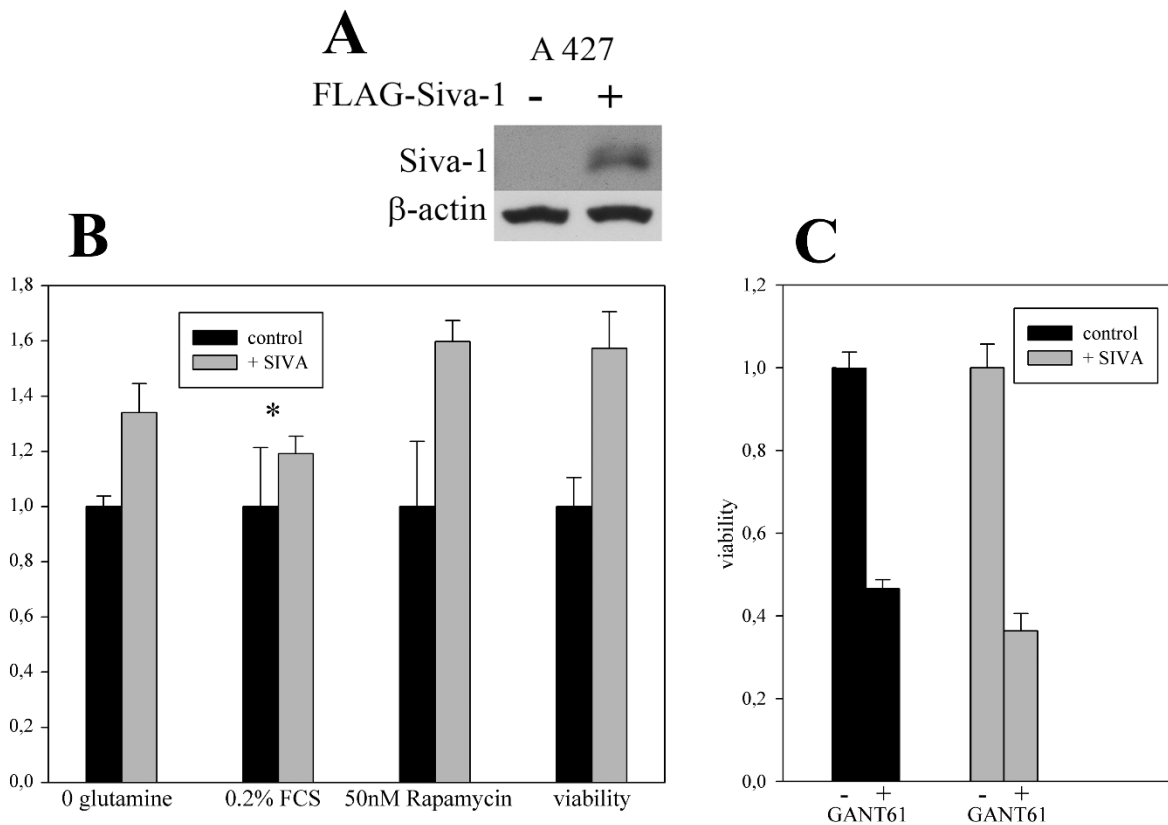
Obrázek 11. Subcelulární lokalizace fúzního proteinu SIVA-EGFP ve dvou typech nádorových buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic. V obou typech buněk je zřetelná jaderná lokalizace SIVA-1 proteinu. Jako kontrola byl použit pouze EGFP konstrukt/plazmid. Barvení jader bylo provedenou pomocí DAPI.

4.2.7 Citlivost buněk nemalobuněčného karcinomu plic s vneseným SIVA-1 proteinem na metabolické a růstové zásahy

Přestože korelace mezi rychlostí proliferace s hladinou proteinu SIVA-1 u testovaných nádorových buněčných linií nebyla prokázána (kapitola 4.2.4), byla dále zkoumána možnost, zda přítomnost proteinu SIVA-1 v buňkách nemalobuněčného karcinomu plic může souviset s dalšími parametry buněčného růstu (růstová a metabolická deprivace za/bez přítomnosti inhibitorů).

Za tímto účelem byly připraveny stabilně transfektované buňky nemalobuněčného karcinomu plic z linie A427, které mají normálně pouze nepatrnou hladinu proteinu SIVA-1. Byl připraven expresní vektor s N-terminálním označením FLAG-SIVA. Jak již bylo zmíněno, účinnost konstruktů SIVA-FLAG a SIVA-1 bez FLAG byla stejná při testování v reportérových systémech se survivinovým promotérem (kapitola 4.2.5). Jako kontrola byl použit prázdný FLAG-plazmid bez SIVA-1.

Po selekci buněk v geneticinu (aminoglykosidové antibiotikum strukturálně podobné gentamicinu B1) byly získány „pools“ buněk i jednotlivé klony buněčné linie A427 stabilně produkující exogenní protein SIVA-1 (**Obrázek 12, část A**). Oba typy buněk linie A427, tedy s FLAG-SIVA-1 a kontrolní bez FLAG-SIVA, byly podrobeny další analýze za pozměněných metabolických podmínek. V kultivačním médiu bez glutaminu byl růst buněk a jejich viabilita vyšší u buněk s FLAG-SIVA-1. Toto pozorování naznačuje, že přítomnost proteinu SIVA-1 zvyšuje odolnost buněk při glutaminové deprivaci a obecně zvyšuje životnost zkoumaných buněk (**Obrázek 12, část B**). Naopak, rozdíl rychlosti růstu mezi oběma typy buněk v případě deprivace kultivačního média (pouze 0,2 % telecí sérum po 2 dny) nebyl statisticky významný, přestože buňky s FLAG-SIVA-1 rostly oproti kontrolním nepatrně rychleji. Buňky FLAG-SIVA-1 byly také rezistentnější vůči přidanému mTOR inhibitoru (rapamycin), ale poněkud více citlivé vůči inhibitoru Hedgehog dráhy (GANT61) (**Obrázek 12, část B a C**). Toto zjištění tak plně koreluje s předchozími výsledky, neboť aktivuje-li SIVA-1 signální dráhu Hedgehog, je pak logické, že je citlivější vůči inhibitoru této dráhy.



Obrázek 12. Citlivost na metabolické a růstové zásahy u nádorové buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic A427 s ektopicky přeneseným vektorem pro SIVA-1 a bez něj. FLAG-SIVA-1 expresní vektor byl transfektován do buněčné linie A427 (nemalobuněčný karcinom plic), která má téměř nulovou hladinou proteinu SIVA-1. FLAG-SIVA-1 pozitivní klony byly selektovány v geneticinu (G418). Jako kontrola sloužil plazmid pFLAG-CMV-4. (A) Exogenně a stabilně protein produkující buňky. (B, C) Kontrolní buňky a buňky ektopicky produkující SIVA-1 protein byly testovány v různých růstových deprivacích podmínkách, byla zjišťována jejich viabilita a růst v přítomnosti inhibitorů (rapamycin – inhibitor mTOR dráhy, a GANT61 – inhibitor Hedgehog dráhy).
* - statisticky nesignifikantní.

5. Diskuze

Bronchogenní karcinom i přes pokračující výzkum a rozvíjející poznání nadále patří mezi onemocnění, která se výrazným způsobem podílí na morbiditě a mortalitě populace. Za posledních 20 let bylo více objasněno molekulárně genetické pozadí u nemalobuněčného karcinomu plic, což umožnilo vývoj cílené protinádorové léčby a zlepšení přežívání u vybrané části pacientů s tímto onemocněním. Další intenzivní výzkum v této oblasti je však nadále žádoucí, neboť u nádoru se může vyvinout sekundární rezistence proti cílené protinádorové léčbě (Aldea M. et al., 2021). V naší práci jsme se proto zabývali studiem významu signální dráhy Hedgehog a proteinu SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic.

Signální dráha Hedgehog je nesmírně důležitá v embryonálním vývoji obecně a zejména pak v embryogenezi plic. V plicích se její vliv uplatňuje také v dospělosti, a to jak za fyziologických podmínek, tak při patologické aktivaci v rámci karcinogeneze (Abe Y., Tanaka N., 2016). V naší výzkumné práci jsme tak zkoumali, jaká je exprese dráhy Hedgehog a jejích jednotlivých komponent u nemalobuněčného karcinomu plic a u některých dalších nádorů. Zjistili jsme, že aktivita signální dráhy Hedgehog v buněčných liniích lidského nemalobuněčného karcinomu plic byla enormně zvýšená. Navíc, exprese pouze samotného ligandu této dráhy (sonic Hedgehog) se velmi lišila u jednotlivých nádorů. Toto zjištění je velmi zajímavé a nepřímou ukazuje na autokrinní/parakrinní aktivaci Hedgehog dráhy (v případě aktivace kanonickou cestou) a tato aktivace je tak možná i při nižší expresi ligandu. Nicméně, jak již bylo uvedeno v literárním úvodu, aktivace této dráhy je možná i nenakonickou cestou, tedy bez nutnosti vazby ligandu na receptor Patched.

Několik předešlých prací prokázalo, že látka GANT61 inhibuje signální dráhu Hedgehog, ovšem na jiných typech buněčných linií, než které jsme ke studiu této dráhy využívali (Vlckova K. et al. 2016; Mazumdar T. et al., 2011; Po A. et al., 2017; Desch P. et al., 2010). Proto jsme také přistoupili u našich zkoumaných nádorových buněčných linií (nemalobuněčného karcinomu plic a dalších) k testování inhibice buněčné proliferace inhibítorem Hedgehog dráhy (inhibitor GANT61). Zjistili jsme, že vybrané buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic nebyly na konci experimentu citlivé k působení tohoto inhibítora. Obdobná situace byla i v případě tří buněčných linií karcinomu pankreatu, které navíc patřily k nejvíce rezistentním vůči zkoumanému inhibítora, ačkoli některé předchozí práce ukazovaly na možnou sensitivitu (Miyazaki Y. et al., 2016; Lauth M., Toftgård R., 2011).

V průlomové původní práci Van Nostrandové a kolektivu, ze které vycházela druhá část hypotéz a cílů pro naši další práci, bylo ukázáno na myším modelu, že přítomnost SIVA-1 je nutná pro vývoj adenokarcinomu u myši (Van Nostrand J. L. et al., 2015). Autoři použili geneticky modifikovaný myší hybridní kmen s mutovaným KRAS onkogenem, ve kterém bylo možné inducibilně provést knockout genu pro SIVA-1 pouze v plicní tkáni. Nádory byly indukovány chemicky karcinogenem a vznikaly u SIVA-1 pozitivních myši ve vysokém procentu (nad 90 %). Po současném inducibilním vyřazení genu SIVA-1 specificky pomocí LoxA-Cre rekombinasy (intratracheální instilací Cre-AAV viru) však nádory vznikaly zcela sporadicky, a to navíc pouze benigní adenomy.

Další jejich pozorování ukázalo na zpomalený růst nádorů v buněčné kultuře a snížení aktivity mTOR signální dráhy po knockdownu SIVA-1 pomocí shRNA (Van Nostrand J. L. et al., 2015). Protein SIVA-1 tedy též stimuloval metabolickou aktivitu nádorových buněk. Toto zjištění bylo překvapivé vzhledem k tomu, že protein SIVA-1 byl do té doby považován za typický proapoptotický (tedy protinádorový) faktor (podobně jako například BAX, BAD, BAK, PUMA, NOXA) jehož transkripce je (stejně jako u ostatních proapoptotických genů) řízena tumor supresorovým genem p53. Protein SIVA-1 však ve všech ostatních tkáních kromě plicní nadále fungoval proapoptoticky. Tato výše uvedená nově zjištěná protichůdná (proonkogenní) aktivita proteinu SIVA-1 právě pouze u nemalobuněčného karcinomu plic, a především jeho nezbytná důležitost při vývoji tohoto nádoru na myším modelu nás vedly k tomu, abychom studovali jeho expresi a funkci ve vzorcích nádorových buněk lidských nemalobuněčných karcinomů (a kontrolních vzorcích normálního parenchymu) plic získaných přímo od pacientů, kteří na našem pracovišti podstoupili chirurgický výkon pro tuto diagnózu.

V našem souboru bylo zařazeno 39 pacientů, kteří v období mezi únorem roku 2016 a srpnem roku 2019 podstoupili anatomickou plicní resekci (lobektomie, bilobektomie, pneumonektomie) pro předem histologicky verifikovaný nemalobuněčný karcinom plic. Průměrný věk pacientů v tomto souboru byl 68,4 let, poměr žen a mužů byl přibližně vyrovnaný a nepřekvapivě většina pacientů z tohoto souboru měla jednoznačně dokumentovanou anamnézu kouření cigaret (ať již aktivního v době operace nebo v minulosti). Pouze jeden pacient z tohoto souboru před operací podstoupil neoadjuvantní chemoradioterapii. Poměr histologických typů adenokarcinomu a dlaždicobuněčného karcinomu byl v podstatě vyrovnaný, třetím zaznamenaným histologickým typem byl adenoskvamózní karcinom, který byl však zaznamenán pouze ve dvou případech. Bližší klinicko-patologická data jsou uvedena v **Tabulce 1**.

U vzorků nádorů a příslušných kontrolních vzorků tumorem nepostiženého plicního parenchymu od každého pacienta v souboru jsme zkoumali hladinu proteinu SIVA-1 pomocí Western blotu. Naše výsledky na tomto souboru ukázaly, že hladina proteinu SIVA-1 je obecně zvýšena (někdy extrémně silně) v nádorové tkáni oproti kontrolní zdravé plicní tkáni v rámci jednoho pacienta. Zároveň je nutno podotknout, že bylo zjištěno i menší procento tumorů, u nichž byla hladina SIVA-1 velmi nízká a/nebo nebyla protilátkou detekována. U jediného pacienta, který podstoupil neoadjuvantní chemoterapii, byla hladina proteinu SIVA-1 přibližně stejná v nádorové i kontrolní zdravé plicní tkáni. To by mohlo naznačovat (zatím pouze hypoteticky), že onkologická léčba před operací mohla hladinu proteinu SIVA-1 v nádoru snížit. Na definitivní potvrzení tohoto předpokladu by však bylo nutné provést další studie. Co je však nejdůležitější, kontrolní zdravý plicní parenchym nikde nevykázal větší expresi proteinu SIVA-1 než nádor u příslušného pacienta (**Obrázek 7**). Naše výsledky tak ukazují na obecně zvýšenou expresi SIVA-1 ve zkoumaných vzorcích nemalobuněčného karcinomu plic a podporují tak hypotézu, že má tento protein onkogenní funkci nejen u myšního modelu nemalobuněčného karcinomu plic ale i lidského nemalobuněčného karcinomu plic.

Dalším krokem bylo stanovení SIVA-1 mRNA ve vzorcích nádorů a příslušné kontrolní zdravé plicní tkáni pomocí metody real-time PCR. Kromě výše uvedeného vzorku od pacienta po neoadjuvantní onkologické léčbě, byla ve všech analyzovaných vzorcích RNA vždy zvýšena v nádorové tkáni oproti kontrole, což svědčí o transkripci jako o procesu, který výrazně ovlivňuje hladinu proteinu SIVA-1 v nádorové tkáni vůči kontrole (**Obrázek 8**).

Následně jsme stanovovali hladinu proteinu SIVA-1 pomocí Western blotu i u buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic a některých dalších typů nádorů (**Obrázek 9**). Hladina proteinu SIVA-1 se lišila jak napříč různými typy nádorových buněk, tak i v rámci jednotlivých linií nemalobuněčného karcinomu plic. Podstatným zjištěním je, že v buněčných liniích kultivovaných buněk normálního bronchiálního epitelu (NHBE) byla exprese proteinu SIVA-1 poměrně vysoká, což by mohlo značit možnou úlohu tohoto proteinu při karcinogenezi lidských plicních nádorů. Absence exprese proteinu SIVA-1 v těchto normálních epiteliálních bronchiálních buňkách by totiž vylučovala hypotézu, že přítomnost tohoto proteinu je nutná pro vývoj nemalobuněčného karcinomu plic u myši (Van Nostrand J. L. et al., 2015). Tato zjištění zároveň implikují, že nádorové buňky neexprimující protein SIVA-1 mohly ztratit schopnost exprese až během progresu nádoru, a to pravděpodobně proto, že jeho onkogenní úlohu v průběhu mutagenese převzal jiný onkogenní protein nebo proteiny. U těchto nádorových buněk je tak možno uvažovat o tom,

že protein SIVA-1 má úlohu při iniciaci nádoru (což samozřejmě není v rozporu s možností, že SIVA-1 iniciuje nádor i u takových maligních buněk, které si jeho expresi zachovaly).

Dále jsme zkoumali, zda inherentní přítomnost proteinu SIVA-1 v buňkách lidského nemalobuněčného karcinomu plic v buněčné kultuře přináší buňkám proliferační výhodu. K tomu byly vybrány dvě buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic s nízkou nebo žádnou hladinou proteinu SIVA-1 a dvě buněčné linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic s vysokou hladinou proteinu SIVA-1. Tímto experimentem jsme neprokázali žádnou korelaci mezi hladinou proteinu SIVA-1 a rychlostí proliferace. Z toho lze usuzovat, že ať už je hladina proteinu SIVA-1 vysoká či nízká, během progresu nádoru a dalších mnoha pasáží v buněčné kultuře se buňky adaptovaly a proliferovaly typickou svojí rychlostí nezávisle na hladině proteinu SIVA-1. Celkově lze tedy říct, že hladina proteinu SIVA-1 v nádorových liniích je velmi variabilní, u nemalobuněčného karcinomu plic nesouvisí s růstovou rychlostí, přestože je zde jeho exprese relativně častější a vyšší než u ostatních typů nádorů.

V další části práce jsme zkoumali, jakým mechanismem by mohl být protein SIVA-1 onkogenní u lidského nemalobuněčného karcinomu plic. Protože signální dráha Hedgehog má také významnou úlohu při vzniku nemalobuněčného karcinomu plic, použili jsme k tomuto experimentu promoter-reporterový systém pro survivin, o kterém bylo nedávno zjištěno, že je transkripčním cílem právě dráhy Hedgehog (Vlckova K. et al., 2016) (**Obrázek 10**). Naše výsledky vedly ke zcela novému originálnímu zjištění, že protein SIVA-1 aktivuje signální dráhu Hedgehog u nemalobuněčného karcinomu plic. Přestože přesný molekulární mechanismus aktivace transkripce proteinem SIVA-1 ještě zbývá detailně objasnit, ukazují tyto výsledky na zcela opačnou (proonkogenní) roli proteinu SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic než u jiných buněčných typů, kde je jeho funkce antionkogenní. Zjistili jsme tedy zcela novou proonkogenní funkci proteinu SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic, kterou je aktivace signální dráhy Hedgehog. Protože tato aktivovaná signální dráha hraje ústřední úlohu u nemalobuněčného karcinomu plic ale i u jiných nádorů, námi zkoumaný protein by mohl působit proonkogenně kromě aktivace mTOR dráhy i aktivací Hedgehog dráhy (a tím zvýšením exprese onkogenního proteinu survivinu).

Dalšími experimenty jsme pak prokázali lokalizaci proteinu SIVA-1 do buněčného jádra, což je v souladu s předchozím zjištěním, že SIVA-1 má jadernou funkci (jejíž přesný mechanismus ještě zbývá objasnit), kterým je tedy podpora konečné transkripce signální dráhy Hedgehog, jak bylo originálně zjištěno na survivinovém promoteru.

Při zkoumání citlivosti buněk nemalobuněčného karcinomu plic s vneseným SIVA-1 proteinem na metabolické a růstové zásahy jsme zjistili, že přítomnost proteinu SIVA-1 v tomto typu nádorových buněk o něco zvyšuje jejich viabilitu a zvyšuje rychlost růstu v kultivačním médiu bez glutaminu.

Naše výsledky přinesly zcela nové originální poznatky v oblasti základního onkologického výzkumu u nemalobuněčného karcinomu plic. Protože molekulární biologie nádorů je komplexní, další experimentální práce nejen v této konkrétní oblasti jsou nadále žádoucí. Navazující výzkum a hlubší poznání přesných mechanismů aktivace dráhy Hedgehog proteinem SIVA-1 by v budoucnu mohl vést i k vývoji specifické cílené protinádorové léčby u nemalobuněčného karcinomu plic.

6. Závěr

Náš výzkum předložený v této práci potvrdil, že jednotlivé komponenty signální dráhy Hedgehog jsou exprimovány u zkoumaných buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic. V návaznosti na to jsme zjistili, že tyto linie nemalobuněčného karcinomu plic však nejsou citlivé k působení inhibitoru GANT61, který má jinak inhibiční vliv na dráhu Hedgehog.

V další části práce jsme se věnovali významu proteinu SIVA-1 u lidského nemalobuněčného karcinomu plic na souboru 39 pacientů s tímto onemocněním. V žádném vzorku nádoru a kontrolního zdravého plicního parenchymu v rámci stejného pacienta jsme nezaznamenali, že by exprese proteinu SIVA-1 byla větší ve vzorku zdravé tkáně než v nádorové tkáni, což významně svědčí pro podporu hypotézy, že tento protein se účastní na karcinogenezi u lidského nemalobuněčného karcinomu plic. Na základě provedených experimentů jsme dále jednoznačně neprokázali souvislost mezi mírou exprese proteinu SIVA-1 v nádoru a proliferační a růstovou výhodou.

Za nejdůležitější nález v naší práci lze považovat zcela nové a originální zjištění, že protein SIVA-1 aktivuje signální dráhu Hedgehog, která má při patologicky zvýšené aktivaci proonkogenní vliv. Jedná se o potvrzení onkogenní role proteinu SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic, i když v jiných tkáních je jeho funkce především proapoptotická (tedy antionkogenní, tumor supresorová). Nicméně, k dalšímu přesnému pochopení detailního mechanismu této tkáňově specifické proonkogenní funkce proteinu SIVA-1 u lidského nemalobuněčného karcinomu plic bude třeba další výzkum.

Závěrem lze shrnout, že provedené výzkumné práce zcela splnily cíle tohoto studia a přispěly tak k dalšímu poznání komplexního molekulárně biologického pozadí u lidského nemalobuněčného karcinomu plic.

7. Souhrn (v českém a anglickém jazyce)

7.1 Souhrn

Tato disertační práce prezentuje základní onkologický výzkum v oblasti lidského nemalobuněčného karcinomu plic. Nemalobuněčný karcinom plic se stále výraznou měrou podílí na morbiditě a mortalitě v celosvětové populaci. Další základní výzkum v této oblasti pak přispívá k hlubšímu pochopení molekulárního pozadí tohoto onemocnění a zvyšuje tak možnosti vývoje účinné cílené protinádorové léčby. V úvodní části práce je kromě obecných informací o bronchogenním karcinomu předložen i literární vhled do současného poznání v oblasti genetických aberací u nemalobuněčného karcinomu plic a v současnosti klinicky nejběžněji stanovovaných driver mutací u tohoto onemocnění. Dále jsou zde shrnuty dosavadní poznatky o dalších molekulárních mechanismech a experimentálních cílech, které se mohou podílet na vzniku nemalobuněčného karcinomu. Jde o signální dráhy Hedgehog, mTOR a protein SIVA-1. Smyslem této práce bylo zvýšit úroveň poznání o funkci signální dráhy Hedgehog a proteinu SIVA-1 a jejich potenciálním vztahu u lidského nemalobuněčného karcinomu plic. Ke splnění tohoto cíle jsou v práci uvedeny relevantní experimentální metody. První část výsledků této práce především ukázala, že jednotlivé komponenty signální dráhy Hedgehog jsou exprimovány u buněčných linií lidského nemalobuněčného karcinomu plic. Dále bylo zjištěno, že zkoumané buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic nebyly citlivé k působení specifického inhibitoru signální dráhy Hedgehog. Druhá část výsledků prokázala, že protein SIVA-1, který je obecně známý pro svou tumor supresorovou funkci, je přítomen v nádorové tkáni lidského nemalobuněčného karcinomu plic, což podporuje hypotézu, že jeho funkce u těchto nádorů je onkogenní. Nejpodstatnějším novým a originálním nálezem je především zjištění, že protein SIVA-1 aktivuje signální dráhu Hedgehog, čímž byl naznačen jeden z možných mechanismů proonkogenního působení proteinu SIVA-1 u lidského nemalobuněčného karcinomu plic. Tyto a další výsledky jsou diskutovány v příslušné části disertační práce. Závěry této disertační práce tak přinášejí další nová zjištění do komplexní problematiky procesu karcinogeneze u nemalobuněčného karcinomu plic. V případě navazujícího základního výzkumu by tato zjištění mohla v budoucnu potenciálně přispět i k vývoji účinnějších cílených protinádorových léčiv u lidského nemalobuněčného karcinomu plic.

7.2 Summary

This thesis represents basic oncological research in non-small cell lung cancer. Non-small cell lung cancer constantly contributes to morbidity and mortality of the population worldwide. Further basic research in this field continues to improve deeper understanding of the molecular background of this disease and increases possibilities of effective targeted anticancer treatment development. In the introductory part, apart from general information on bronchogenic carcinoma, literary insight into current level of knowledge on genetic aberrations and commonly examined driver mutations in non-small cell lung cancer is provided. Moreover, current knowledge on other molecular mechanisms and experimental subjects, such as Hedgehog and mTOR signaling pathway or SIVA-1 protein, that might participate in development of human non-small cell cancer. The aim of this study was to clarify the importance of Hedgehog signaling pathway and protein SIVA-1 and their potential relationship in development and progression of human non-small cell lung cancer. Relevant experimental methods are described in the methods section. First part of this experimental work detected that each single component of Hedgehog signaling pathway is expressed in cell lines of human non-small cell lung cancer. Further analysis revealed that investigated cell lines were not sensitive to inhibitory effect of specific inhibitor of Hedgehog signaling pathway. Second part of presented results demonstrated that SIVA-1 protein (which originally well known for its tumour suppression function) is present in tumour tissue of human non-small cell lung cancer. This finding supports the hypothesis that SIVA-1 protein has oncogenic role specifically in non-small cell lung cancer. The most crucial is novel and original finding, that SIVA-1 protein activates the Hedgehog signaling pathway. This suggests one of possible mechanisms of oncogenic role of SIVA-1 protein in non-small cell lung cancer. All these findings are discussed in appropriate part of the thesis. In conclusion, this study contributed to complex problematics of non-small cell lung cancer development. Further basic research in this area might potentially contribute to development of more effective targeted anticancer treatment of non-small cell lung cancer.

Vlastní publikace (chronologicky)

Réda, J., Vachtenheim, J., Vlčková, K., Horák, P., **Vachtenheim Jr, J.** and Ondrušová, L. (2018) 'Widespread expression of hedgehog pathway components in a large panel of human tumor cells and inhibition of tumor growth by GANT61: implications for cancer therapy', *International journal of molecular sciences*, 19(9), pp. 2682. **IF₂₀₂₀=5.923**

Vachtenheim Jr, J., Lischke, R. and Vachtenheim, J. (2018) 'Siva-1 emerges as a tissue-specific oncogene beyond its classic role of a proapoptotic gene', *OncoTargets and therapy*, 11, pp. 6361. **IF₂₀₂₀=4.147**

Vachtenheim Jr, J. and Lischke, R. (2019) 'Esophageal bypass surgery as a definitive repair of recurrent acquired benign bronchoesophageal fistula', *Journal of cardiothoracic surgery*, 14(1), pp. 1-4. **IF₂₀₂₀=1.637**

Strizova, Z., **Vachtenheim Jr, J.** and Bartunkova, J. (2019) 'The potential role of neutrophil trogocytosis and G-CSF in the loss of HER2 expression', *Breast cancer research and treatment*, 178(1), pp. 247-248. **IF₂₀₂₀=4.872**

Strizova, Z., Snajdauf, M., Stakheev, D., Taborska, P., **Vachtenheim Jr, J.**, Biskup, J., Lischke, R., Bartunkova, J. and Smrz, D. (2020) 'The paratumoral immune cell signature reveals the potential for the implementation of immunotherapy in esophageal carcinoma patients', *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146, pp. 1979-1992. **IF₂₀₂₀=4.553**

Strizova, Z., **Vachtenheim Jr, J.**, Snajdauf, M., Lischke, R., Bartunkova, J. and Smrz, D. (2020) 'Tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells of esophageal carcinoma patients express high levels of CD47', *Scientific reports*, 10(1), pp. 1-9. **IF₂₀₂₀=4.379**

Vachtenheim Jr, J., Kodet, R., Fischer, O., Kolek, V., Strizova, Z., Ozaniak, A., Simonek, J., Stolz, A., Pozniak, J., Kolarik, J., Svorcova M., Vachtenheim, J. and Lischke, R. (2020) 'Giant lung metastasis of NRAS-mutant melanoma in a 24-year-old patient with a history of BRAF-mutant conventional melanoma harboring Spitzoid morphology: a case report', *Diagnostic pathology*, 15(1), pp. 1-7. **IF₂₀₂₀=2.644**

Švorcová, M., Havlín, J., **Vachtenheim Jr, J.**, Kolařík, J., Pozniak, J., Šimonek, J., Burkert, J. and Lischke, R. (2020) 'Malignancy after lung transplantation', *Rozhledy v Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*, 99(10), pp. 447-455.

Snajdauf, M., Havlova, K., **Vachtenheim Jr, J.**, Ozaniak, A., Lischke, R., Bartunkova, J., Smrz, D. and Strizova, Z. (2021) 'The TRAIL in the Treatment of Human Cancer: An Update on Clinical Trials', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, pp. 87. **IF₂₀₂₀=5.246**

Durila, M., Vajter, J., Garaj, M., Pollert, L., Berousek, J., **Vachtenheim Jr, J.**, Vymazal, T. and Lischke, R. (2021) 'Rotational thromboelastometry reduces blood loss and blood product usage after lung transplantation', *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 40(7), pp. 631-641, **IF₂₀₂₀=10.247**

Ozaniak, A., **Vachtenheim Jr, J.**, Lischke, R., Bartunkova, J. and Strizova, Z. (2021) 'Novel Insights into the Immunotherapy of Soft Tissue Sarcomas: Do We Need a Change of Perspective?', *Biomedicines*, 9(8), pp. 935. **IF₂₀₂₀=6.081**

Kapitola v monografii:

Vachtenheim, Jiří. Solitární fibrózní tumor. In: Lischke, Robert, Ozaniak, Andrej a kol. *Sarkomy měkkých tkání*, Praha: Maxdorf, 2020, s. 122-127, ISBN: 978-80-7345-614-6

Použitá literatura

Abe, Y. and Tanaka, N. (2016) 'The Hedgehog Signaling Networks in Lung Cancer: The Mechanisms and Roles in Tumor Progression and Implications for Cancer Therapy', *Biomed Res Int*, 2016, pp. 7969286.

Ahrendt, S. A., Chow, J. T., Xu, L. H., Yang, S. C., Eisenberger, C. F., Esteller, M., Herman, J. G., Wu, L., Decker, P. A., Jen, J. and Sidransky, D. (1999) 'Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer', *J Natl Cancer Inst*, 91(4), pp. 332-9.

Alberg, A. J. and Samet, J. M. (2003) 'Epidemiology of lung cancer', *Chest*, 123(1 Suppl), pp. 21S-49S.

Aldea, M., Andre, F., Marabelle, A., Dogan, S., Barlesi, F. and Soria, J. C. (2021) 'Overcoming Resistance to Tumor-Targeted and Immune-Targeted Therapies', *Cancer Discov*, 11(4), pp. 874-899.

Balsara, B. R., Pei, J., Mitsuuchi, Y., Page, R., Klein-Szanto, A., Wang, H., Unger, M. and Testa, J. R. (2004) 'Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions', *Carcinogenesis*, 25(11), pp. 2053-9.

Barber, L. J., Davies, M. N. and Gerlinger, M. (2015) 'Dissecting cancer evolution at the macro-heterogeneity and micro-heterogeneity scale', *Curr Opin Genet Dev*, 30, pp. 1-6.

Barkinge, J. L., Gudi, R., Sarah, H., Chu, F., Borthakur, A., Prabhakar, B. S. and Prasad, K. V. (2009) 'The p53-induced Siva-1 plays a significant role in cisplatin-mediated apoptosis', *J Carcinog*, 8, pp. 2.

Beachy, P. A., Karhadkar, S. S. and Berman, D. M. (2004) 'Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis', *Nature*, 432(7015), pp. 324-31.

Beckett, W. S. (1993) 'Epidemiology and etiology of lung cancer', *Clin Chest Med*, 14(1), pp. 1-15.

Bellusci, S., Furuta, Y., Rush, M. G., Henderson, R., Winnier, G. and Hogan, B. L. (1997) 'Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis', *Development*, 124(1), pp. 53-63.

Bermudez, O., Hennen, E., Koch, I., Lindner, M. and Eickelberg, O. (2013) 'Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation', *PLoS One*, 8(5), pp. e63226.

Biegging, K. T., Mello, S. S. and Attardi, L. D. (2014) 'Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression', *Nat Rev Cancer*, 14(5), pp. 359-70.

Bittoni, M., Yang, J. C., Shih, J. Y., Peled, N., Smit, E. F., Camidge, D. R., Arasada, R. R., Oksen, D., Boutmy, E., Stroh, C., Johne, A., Carbone, D. P. and Paik, P. K. (2021) 'Real-world insights into patients with advanced NSCLC and MET alterations', *Lung Cancer*, 159, pp. 96-106.

Brady, C. A., Jiang, D., Mello, S. S., Johnson, T. M., Jarvis, L. A., Kozak, M. M., Kenzelmann Broz, D., Basak, S., Park, E. J., McLaughlin, M. E., Karnezis, A. N. and Attardi, L. D. (2011) 'Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression', *Cell*, 145(4), pp. 571-83.

Brenner, D. R., Boffetta, P., Duell, E. J., Bickeboller, H., Rosenberger, A., McCormack, V., Muscat, J. E., Yang, P., Wichmann, H. E., Brueske-Hohlfeld, I., Schwartz, A. G., Cote, M. L., Tjonneland, A., Friis, S., Le Marchand, L., Zhang, Z. F., Morgenstern, H., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Zaridze, D., Rudnai, P., Fabianova, E., Foretova, L., Janout, V., Bencko, V., Schejbalova, M., Brennan, P., Mates, I. N., Lazarus, P., Field, J. K., Raji, O., McLaughlin, J. R., Liu, G., Wiencke, J., Neri, M., Ugolini, D., Andrew, A. S., Lan, Q., Hu, W., Orlow, I., Park, B. J. and Hung, R. J. (2012) 'Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium', *Am J Epidemiol*, 176(7), pp. 573-85.

Cao, C., Ren, X., Kharbanda, S., Koleske, A. J., Prasad, K. V. and Kufe, D. (2001) 'The ARG tyrosine kinase interacts with Siva-1 in the apoptotic response to oxidative stress', *J Biol Chem*, 276(15), pp. 11465-8.

Chen, D., Shan, J., Zhu, W. G., Qin, J. and Gu, W. (2010) 'Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses', *Nature*, 464(7288), pp. 624-7.

Chial, H. 2008. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education* 1 (1): 33 What drives cancer cells to grow and divide uncontrollably turning into cancer? Studies of proto-oncogenes reveal some clues about how normal cellular processes mutate and go awry. Figure.

Chial, H. (2008) 'Tumor suppressor (TS) genes and the two-hit hypothesis', *Nature Education*, 1(1), pp. 177.

Choe, C., Shin, Y.-S., Kim, S.-H., Jeon, M.-J., Choi, S.-J., Lee, J. and Kim, J. (2013) 'Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance motility of non-small cell lung cancer cells through the hedgehog signaling pathway', *Anticancer research*, 33(9), pp. 3715-3723.

Conde, E., Angulo, B., Tang, M., Morente, M., Torres-Lanzas, J., Lopez-Encuentra, A., Lopez-Rios, F. and Sanchez-Cespedes, M. (2006) 'Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling', *Clin Cancer Res*, 12(3 Pt 1), pp. 710-7.

Della Corte, C. M., Bellevicine, C., Vicidomini, G., Vitagliano, D., Malapelle, U., Accardo, M., Fabozzi, A., Fiorelli, A., Fasano, M. and Papaccio, F. (2015) 'SMO gene amplification and activation of the hedgehog pathway as novel mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human lung cancer', *Clinical cancer research*, 21(20), pp. 4686-4697.

Desch, P., Asslaber, D., Kern, D., Schnidar, H., Mangelberger, D., Alinger, B., Stoecher, M., Hofbauer, S., Neureiter, D. and Tinhofer, I. (2010) 'Inhibition of GLI, but not Smoothed, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells', *Oncogene*, 29(35), pp. 4885-4895.

Devarakonda, S., Rotolo, F., Tsao, M. S., Lanc, I., Brambilla, E., Masood, A., Olaussen, K. A., Fulton, R., Sakashita, S., McLeer-Florin, A., Ding, K., Le Teuff, G., Shepherd, F. A., Pignon, J. P., Graziano, S. L., Kratzke, R., Soria, J. C., Seymour, L., Govindan, R. and Michiels, S. (2018) 'Tumor Mutation Burden as a Biomarker in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer', *J Clin Oncol*, 36(30), pp. 2995-3006.

Dhillon, T., Mauri, F. A., Bellezza, G., Cagini, L., Barbareschi, M., North, B. V. and Seckl, M. J. (2010) 'Overexpression of the mammalian target of rapamycin: a novel biomarker for poor survival in resected early stage non-small cell lung cancer', *J Thorac Oncol*, 5(3), pp. 314-9.

Dobashi, Y., Koyama, S., Kanai, Y. and Tetsuka, K. (2011) 'Kinase-driven pathways of EGFR in lung carcinomas: perspectives on targeting therapy', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, pp. 1714-32.

Drusbosky, L. M., Rodriguez, E., Dawar, R. and Ikpeazu, C. V. (2021) 'Therapeutic strategies in RET gene rearranged non-small cell lung cancer', *J Hematol Oncol*, 14(1), pp. 50.

Du, W., Jiang, P., Li, N., Mei, Y., Wang, X., Wen, L., Yang, X. and Wu, M. (2009) 'Suppression of p53 activity by Siva1', *Cell Death Differ*, 16(11), pp. 1493-504.

Forbes, S. A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C. Y., Beare, D., Jia, M., Shepherd, R., Leung, K., Menzies, A., Teague, J. W., Campbell, P. J., Stratton, M. R. and Futreal, P. A. (2011) 'COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer', *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue), pp. D945-50.

Fortin, A., MacLaurin, J. G., Arbour, N., Cregan, S. P., Kushwaha, N., Callaghan, S. M., Park, D. S., Albert, P. R. and Slack, R. S. (2004) 'The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1', *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), pp. 28706-28714.

Gately, K., Al-Alao, B., Dhillon, T., Mauri, F., Cuffe, S., Seckl, M. and O'Byrne, K. (2012) 'Overexpression of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and angiogenesis are poor prognostic factors in early stage NSCLC: a verification study', *Lung Cancer*, 75(2), pp. 217-22.

Gialmanidis, I. P., Bravou, V., Amanetopoulou, S. G., Varakis, J., Kourea, H. and Papadaki, H. (2009) 'Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas', *Lung Cancer*, 66(1), pp. 64-74.

Gialmanidis, I. P., Bravou, V., Petrou, I., Kourea, H., Mathioudakis, A., Lilis, I. and Papadaki, H. (2013) 'Expression of Bmi1, FoxF1, Nanog, and gamma-catenin in relation to hedgehog signaling pathway in human non-small-cell lung cancer', *Lung*, 191(5), pp. 511-21.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100(1), pp. 57-70.

Hopkins, R. J., Duan, F., Chiles, C., Greco, E. M., Gamble, G. D., Aberle, D. and Young, R. P. (2017) 'Reduced Expiratory Flow Rate among Heavy Smokers Increases Lung Cancer Risk. Results from the National Lung Screening Trial-American College of Radiology Imaging Network Cohort', *Ann Am Thorac Soc*, 14(3), pp. 392-402.

Huang, L., Walter, V., Hayes, D. N. and Onaitis, M. (2014) 'Hedgehog-Gli signaling inhibition suppresses tumor growth in squamous lung cancer', *Clin Cancer Res*, 20(6), pp. 1566-75.

Hubbard, R., Venn, A., Lewis, S. and Britton, J. (2000) 'Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study', *Am J Respir Crit Care Med*, 161(1), pp. 5-8.

Hyman, J. M., Firestone, A. J., Heine, V. M., Zhao, Y., Ocasio, C. A., Han, K., Sun, M., Rack, P. G., Sinha, S., Wu, J. J., Solow-Cordero, D. E., Jiang, J., Rowitch, D. H. and Chen, J. K. (2009) 'Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33), pp. 14132-7.

Inamura, K. (2017) 'Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification', *Front Oncol*, 7, pp. 193.

Infante, P., Mori, M., Alfonsi, R., Ghirga, F., Aiello, F., Toscano, S., Ingallina, C., Siler, M., Cucchi, D. and Po, A. (2015) 'Gli1/DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumors', *The EMBO journal*, 34(2), pp. 200-217.

Ingham, P. W. and McMahon, A. P. (2001) 'Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles', *Genes Dev*, 15(23), pp. 3059-87.

Iorio-Morin, C., Germain, P., Roy, S., Genier, S., Labrecque, P. and Parent, J. L. (2012) 'Thromboxane A2 modulates cisplatin-induced apoptosis through a Siva1-dependent mechanism', *Cell Death Differ*, 19(8), pp. 1347-57.

Jacobs, S., Basak, S., Murray, J., Pathak, N. and Attardi, L. (2007) 'Siva is an apoptosis-selective p53 target gene important for neuronal cell death', *Cell Death & Differentiation*, 14(7), pp. 1374-1385.

Jacobsen, K., Bertran-Alamillo, J., Molina, M. A., Teixido, C., Karachaliou, N., Pedersen, M. H., Castellvi, J., Garzon, M., Codony-Servat, C., Codony-Servat, J., Gimenez-Capitan, A., Drozdowskyj, A., Viteri, S., Larsen, M. R., Lassen, U., Felip, E., Bivona, T. G., Ditzel, H. J. and Rosell, R. (2017) 'Convergent Akt activation drives acquired EGFR inhibitor resistance in lung cancer', *Nat Commun*, 8(1), pp. 410.

Kalluri, R. and Weinberg, R. A. (2009) 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *J Clin Invest*, 119(6), pp. 1420-8.

Kan, Z., Jaiswal, B. S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H. M., Yue, P., Haverty, P. M., Bourgon, R., Zheng, J., Moorhead, M., Chaudhuri, S., Tomsho, L. P., Peters, B. A., Pujara, K., Cordes, S., Davis, D. P., Carlton, V. E., Yuan, W., Li, L., Wang, W., Eigenbrot, C., Kaminker, J. S., Eberhard, D. A., Waring, P., Schuster, S. C., Modrusan, Z., Zhang, Z., Stokoe, D., de Sauvage, F. J., Faham, M. and Seshagiri, S. (2010) 'Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers', *Nature*, 466(7308), pp. 869-73.

Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T. and Fasoulakis, Z. (2020) 'Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review', *Anticancer Res*, 40(11), pp. 6009-6015.

Krejčí, D., Pehalová, L., Talábová, A., Pokorová, K., Katinová, I., Mužík J. and Dušek, L. (2021) 'Novotvary 2018' [online]. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [citováno dne 28.8.2021]. Dostupné z <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>

Kugler, M. C., Joyner, A. L., Loomis, C. A. and Munger, J. S. (2015) 'Sonic hedgehog signaling in the lung. From development to disease', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 52(1), pp. 1-13.

Lauth, M. and Toftgård, R. (2011) 'Hedgehog signaling and pancreatic tumor development', *Advances in cancer research*, 110, pp. 1-17.

Leonetti, A., Facchinetti, F., Rossi, G., Minari, R., Conti, A., Friboulet, L., Tiseo, M. and Planchard, D. (2018) 'BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): Pickaxing another brick in the wall', *Cancer Treat Rev*, 66, pp. 82-94.

Li, N., Jiang, P., Du, W., Wu, Z., Li, C., Qiao, M., Yang, X. and Wu, M. (2011) 'Siva1 suppresses epithelial-mesenchymal transition and metastasis of tumor cells by inhibiting stathmin and stabilizing microtubules', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(31), pp. 12851-6.

Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao, Y., Baer, R. and Gu, W. (2012) 'Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence', *Cell*, 149(6), pp. 1269-1283.

Lin, E., Li, L., Guan, Y., Soriano, R., Rivers, C. S., Mohan, S., Pandita, A., Tang, J. and Modrusan, Z. (2009) 'Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers', *Mol Cancer Res*, 7(9), pp. 1466-76.

Lin, F. T., Lai, Y. J., Makarova, N., Tigyi, G. and Lin, W. C. (2007) 'The lysophosphatidic acid 2 receptor mediates down-regulation of Siva-1 to promote cell survival', *J Biol Chem*, 282(52), pp. 37759-69.

Lin, J. J. and Shaw, A. T. (2017) 'Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer', *J Thorac Oncol*, 12(11), pp. 1611-1625.

Liu, L., Kugler, M. C., Loomis, C. A., Samdani, R., Zhao, Z., Chen, G. J., Brandt, J. P., Brownell, I., Joyner, A. L., Rom, W. N. and Munger, J. S. (2013) 'Hedgehog signaling in neonatal and adult lung', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 48(6), pp. 703-10.

Lorigan, P., Radford, J., Howell, A. and Thatcher, N. (2005) 'Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: a systematic review', *Lancet Oncol*, 6(10), pp. 773-9.

Malapelle, U., Passiglia, F., Cremolini, C., Reale, M. L., Pepe, F., Pisapia, P., Avallone, A., Cortinovis, D., De Stefano, A., Fassan, M., Fontanini, G., Galetta, D., Lauricella, C., Listi, A., Loupakis, F., Pagni, F., Pietrantonio, F., Pilotto, S., Righi, L., Bianchi, A. S., Parra, H. S., Tiseo, M., Verze, M., Troncone, G. and Novello, S. (2021) 'RAS as a positive predictive biomarker: focus on lung and colorectal cancer patients', *Eur J Cancer*, 146, pp. 74-83.

Mamane, Y., Petroulakis, E., Rong, L., Yoshida, K., Ler, L. W. and Sonenberg, N. (2004) 'eIF4E—from translation to transformation', *Oncogene*, 23(18), pp. 3172-3179.

Mazumdar, T., DeVecchio, J., Shi, T., Jones, J., Agyeman, A. and Houghton, J. A. (2011) 'Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells', *Cancer research*, 71(3), pp. 1092-1102.

Merchant, A. A. and Matsui, W. (2010) 'Targeting Hedgehog—a cancer stem cell pathway', *Clin Cancer Res*, 16(12), pp. 3130-40.

Miller, L. A., Wert, S. E. and Whitsett, J. A. (2001) 'Immunolocalization of sonic hedgehog (Shh) in developing mouse lung', *J Histochem Cytochem*, 49(12), pp. 1593-604.

Miyazaki, Y., Matsubara, S., Ding, Q., Tsukasa, K., Yoshimitsu, M., Kosai, K.-i. and Takao, S. (2016) 'Efficient elimination of pancreatic cancer stem cells by hedgehog/GLI inhibitor GANT61 in combination with mTOR inhibition', *Molecular cancer*, 15(1), pp. 1-10.

Nenclares, P. and Harrington, K. (2020) 'The biology of cancer', *Medicine*, 48(2), pp. 67-72.

Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P. and Eaves, C. J. (2012) 'Cancer stem cells: an evolving concept', *Nat Rev Cancer*, 12(2), pp. 133-43.

O'Byrne, K. J., Gatzemeier, U., Bondarenko, I., Barrios, C., Eschbach, C., Martens, U. M., Hotko, Y., Kortsik, C., Paz-Ares, L., Pereira, J. R., von Pawel, J., Ramlau, R., Roh, J. K., Yu, C. T., Stroh, C., Celik, I., Schueler, A. and Pirker, R. (2011) 'Molecular biomarkers in non-

small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study', *Lancet Oncol*, 12(8), pp. 795-805.

Peng, T., Frank, D. B., Kadzik, R. S., Morley, M. P., Rathi, K. S., Wang, T., Zhou, S., Cheng, L., Lu, M. M. and Morrisey, E. E. (2015) 'Hedgehog actively maintains adult lung quiescence and regulates repair and regeneration', *Nature*, 526(7574), pp. 578-82.

Po, A., Silvano, M., Miele, E., Capalbo, C., Eramo, A., Salvati, V., Todaro, M., Besharat, Z., Catanzaro, G. and Cucchi, D. (2017) 'Noncanonical GLI1 signaling promotes stemness features and in vivo growth in lung adenocarcinoma', *Oncogene*, 36(32), pp. 4641-4652.

Prasad, K. V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M. X., Rizk, M., Jacquot, S. and Schlossman, S. F. (1997) 'CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12), pp. 6346-51.

Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z. J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Hoffmann, B., Fischer, P., Nieuwenhuijsen, M. J., Brunekreef, B., Xun, W. W., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Sommar, J., Forsberg, B., Modig, L., Oudin, A., Oftedal, B., Schwarze, P. E., Nafstad, P., De Faire, U., Pedersen, N. L., Ostenson, C. G., Fratiglioni, L., Penell, J., Korek, M., Pershagen, G., Eriksen, K. T., Sorensen, M., Tjonneland, A., Ellermann, T., Eeftens, M., Peeters, P. H., Meliefste, K., Wang, M., Bueno-de-Mesquita, B., Key, T. J., de Hoogh, K., Concini, H., Nagel, G., Vilier, A., Grioni, S., Krogh, V., Tsai, M. Y., Ricceri, F., Sacerdote, C., Galassi, C., Migliore, E., Ranzi, A., Cesaroni, G., Badaloni, C., Forastiere, F., Tamayo, I., Amiano, P., Dorronsoro, M., Trichopoulou, A., Bamia, C., Vineis, P. and Hoek, G. (2013) 'Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE)', *Lancet Oncol*, 14(9), pp. 813-22.

Reda, J., Vachtenheim, J., Vlckova, K., Horak, P., Vachtenheim, J., Jr. and Ondrusova, L. (2018) 'Widespread Expression of Hedgehog Pathway Components in a Large Panel of Human Tumor Cells and Inhibition of Tumor Growth by GANT61: Implications for Cancer Therapy', *Int J Mol Sci*, 19(9).

Remon, J., Pignataro, D., Novello, S. and Passiglia, F. (2021) 'Current treatment and future challenges in ROS1- and ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer', *Cancer Treat Rev*, 95, pp. 102178.

Resch, U., Schichl, Y. M., Winsauer, G., Gudi, R., Prasad, K. and de Martin, R. (2009) 'Siva1 is a XIAP-interacting protein that balances NF κ B and JNK signalling to promote apoptosis', *Journal of cell science*, 122(15), pp. 2651-2661.

Resnick-Silverman, L. and Manfredi, J. J. (2015) 'Two Faces of SIVA', *Cancer Discov*, 5(6), pp. 581-3.

Rimkus, T. K., Carpenter, R. L., Qasem, S., Chan, M. and Lo, H. W. (2016) 'Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothened and GLI Inhibitors', *Cancers (Basel)*, 8(2).

Rubin, L. L. and de Sauvage, F. J. (2006) 'Targeting the Hedgehog pathway in cancer', *Nat Rev Drug Discov*, 5(12), pp. 1026-33.

Salido, M., Pijuan, L., Martinez-Aviles, L., Galvan, A. B., Canadas, I., Rovira, A., Zanui, M., Martinez, A., Longaron, R., Sole, F., Serrano, S., Bellosillo, B., Wynes, M. W., Albanell, J., Hirsch, F. R. and Arriola, E. (2011) 'Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer', *J Thorac Oncol*, 6(1), pp. 21-7.

Sands, J. M., Nguyen, T., Shivdasani, P., Sacher, A. G., Cheng, M. L., Alden, R. S., Janne, P. A., Kuo, F. C., Oxnard, G. R. and Sholl, L. M. (2020) 'Next-generation sequencing informs diagnosis and identifies unexpected therapeutic targets in lung squamous cell carcinomas', *Lung Cancer*, 140, pp. 35-41.

Scheffler, M., Bos, M., Gardizi, M., Konig, K., Michels, S., Fassunke, J., Heydt, C., Kunstlinger, H., Ihle, M., Ueckerth, F., Albus, K., Serke, M., Gerigk, U., Schulte, W., Topelt, K., Nogova, L., Zander, T., Engel-Riedel, W., Stoelben, E., Ko, Y. D., Randerath, W., Kaminsky, B., Panse, J., Becker, C., Hellmich, M., Merkelbach-Bruse, S., Heukamp, L. C., Buttner, R. and Wolf, J. (2015) 'PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC):

genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies', *Oncotarget*, 6(2), pp. 1315-26.

Sherr, C. J. and Weber, J. D. (2000) 'The ARF/p53 pathway', *Curr Opin Genet Dev*, 10(1), pp. 94-9.

Shi, Y., Au, J. S., Thongprasert, S., Srinivasan, S., Tsai, C. M., Khoa, M. T., Heeroma, K., Itoh, Y., Cornelio, G. and Yang, P. C. (2014) 'A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER)', *J Thorac Oncol*, 9(2), pp. 154-62.

Shimoda, H. K., Shide, K., Kameda, T., Matsunaga, T. and Shimoda, K. (2010) 'Tyrosine kinase 2 interacts with the proapoptotic protein Siva-1 and augments its apoptotic functions', *Biochem Biophys Res Commun*, 400(2), pp. 252-7.

Sholl, L. M., Aisner, D. L., Varella-Garcia, M., Berry, L. D., Dias-Santagata, D., Wistuba, II, Chen, H., Fujimoto, J., Kugler, K., Franklin, W. A., Iafrate, A. J., Ladanyi, M., Kris, M. G., Johnson, B. E., Bunn, P. A., Minna, J. D., Kwiatkowski, D. J. and Investigators, L. (2015) 'Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience', *J Thorac Oncol*, 10(5), pp. 768-777.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. and Jemal, A. (2021) 'Cancer Statistics, 2021', *CA Cancer J Clin*, 71(1), pp. 7-33.

Soria, J.-C., Lee, H.-Y., Lee, J. I., Wang, L., Issa, J.-P., Kemp, B. L., Liu, D. D., Kurie, J. M., Mao, L. and Khuri, F. R. (2002) 'Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation', *Clinical Cancer Research*, 8(5), pp. 1178-1184.

Spinicelli, S., Nocentini, G., Ronchetti, S., Krausz, L. T., Bianchini, R. and Riccardi, C. (2002) 'GITR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis', *Cell Death Differ*, 9(12), pp. 1382-4.

Strizzi, L., Hardy, K. M., Seftor, E. A., Costa, F. F., Kirschmann, D. A., Seftor, R. E., Postovit, L. M. and Hendrix, M. J. (2009) 'Development and cancer: at the crossroads of Nodal and Notch signaling', *Cancer Res*, 69(18), pp. 7131-4.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA Cancer J Clin*, 71(3), pp. 209-249.

Tan, A. C. (2020) 'Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC)', *Thorac Cancer*, 11(3), pp. 511-518.

Theunissen, J. W. and de Sauvage, F. J. (2009) 'Paracrine Hedgehog signaling in cancer', *Cancer Res*, 69(15), pp. 6007-10.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. and Nieto, M. A. (2009) 'Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease', *Cell*, 139(5), pp. 871-90.

Timofeev, O., Schlereth, K., Wanzel, M., Braun, A., Nieswandt, B., Pagenstecher, A., Rosenwald, A., Elsasser, H. P. and Stiewe, T. (2013) 'p53 DNA binding cooperativity is essential for apoptosis and tumor suppression in vivo', *Cell Rep*, 3(5), pp. 1512-25.

Turner-Warwick, M., Lebowitz, M., Burrows, B. and Johnson, A. (1980) 'Cryptogenic fibrosing alveolitis and lung cancer', *Thorax*, 35(7), pp. 496-9.

Vachtenheim Jr, J., Lischke, R. and Vachtenheim, J. (2018) 'Siva-1 emerges as a tissue-specific oncogene beyond its classic role of a proapoptotic gene', *OncoTargets and therapy*, 11, pp. 6361.

Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J. J. and Stassi, G. (2012) 'Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details', *Nature Reviews Cancer*, 12(11), pp. 767-775.

Valente, L. J., Gray, D. H., Michalak, E. M., Pinon-Hofbauer, J., Egle, A., Scott, C. L., Janic, A. and Strasser, A. (2013) 'p53 efficiently suppresses tumor development in the complete

absence of its cell-cycle inhibitory and proapoptotic effectors p21, Puma, and Noxa', *Cell Rep*, 3(5), pp. 1339-45.

Van Nostrand, J. L., Brisac, A., Mello, S. S., Jacobs, S. B., Luong, R. and Attardi, L. D. (2015) 'The p53 Target Gene SIVA Enables Non-Small Cell Lung Cancer Development', *Cancer Discov*, 5(6), pp. 622-35.

Vlčková, K., Ondrušová, L., Vachtenheim, J., Réda, J., Dundr, P., Zadinová, M., Žáková, P. and Poučková, P. (2016) 'Survivin, a novel target of the Hedgehog/GLI signaling pathway in human tumor cells', *Cell death & disease*, 7(1), pp. e2048-e2048.

Vlčková, K., Réda, J., Ondrušová, L., Krayem, M., Ghanem, G. and Vachtenheim, J. (2016) 'GLI inhibitor GANT61 kills melanoma cells and acts in synergy with obatoclax', *International journal of oncology*, 49(3), pp. 953-960.

Vousden, K. H. and Prives, C. (2009) 'Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53', *Cell*, 137(3), pp. 413-31.

Wadowska, K., Bil-Lula, I., Trembecki, L. and Sliwinska-Mosson, M. (2020) 'Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review', *Int J Mol Sci*, 21(13).

Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N. and Shin, Y. K. (2018) 'Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview', *Cell Physiol Biochem*, 51(6), pp. 2647-2693.

Wang, X., Zha, M., Zhao, X., Jiang, P., Du, W., Tam, A. Y., Mei, Y. and Wu, M. (2013) 'Siva1 inhibits p53 function by acting as an ARF E3 ubiquitin ligase', *Nature communications*, 4(1), pp. 1-9.

Yauch, R. L., Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J. C., Rubin, L. L. and de Sauvage, F. J. (2008) 'A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer', *Nature*, 455(7211), pp. 406-10.

Yoon, Y., Ao, Z., Cheng, Y., Schlossman, S. F. and Prasad, K. (1999) 'Murine Siva-1 and Siva-2, alternate splice forms of the mouse Siva gene, both bind to CD27 but differentially transduce apoptosis', *Oncogene*, 18(50), pp. 7174-7179.

Zhang, X., Liang, Z., Wang, S., Lu, S., Song, Y., Cheng, Y., Ying, J., Liu, W., Hou, Y., Li, Y., Liu, Y., Hou, J., Liu, X., Shao, J., Tai, Y., Wang, Z., Fu, L., Li, H., Zhou, X., Bai, H., Wang, M., Lu, Y., Yang, J., Zhong, W., Zhou, Q., Yang, X., Wang, J., Huang, C., Liu, X., Zhou, X., Zhang, S., Tian, H., Chen, Y., Ren, R., Liao, N., Wu, C., Zhu, Z., Pan, H., Gu, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, S., Liu, T., Chen, G., Shao, Z., Xu, B., Zhang, Q., Xu, R., Shen, L., Wu, Y. and Tumor Biomarker Committee, O. (2019) 'Application of next-generation sequencing technology to precision medicine in cancer: joint consensus of the Tumor Biomarker Committee of the Chinese Society of Clinical Oncology', *Cancer Biol Med*, 16(1), pp. 189-204.

Zheng, M. (2016) 'Classification and Pathology of Lung Cancer', *Surg Oncol Clin N Am*, 25(3), pp. 447-68.

Zito Marino, F., Bianco, R., Accardo, M., Ronchi, A., Cozzolino, I., Morgillo, F., Rossi, G. and Franco, R. (2019) 'Molecular heterogeneity in lung cancer: from mechanisms of origin to clinical implications', *Int J Med Sci*, 16(7), pp. 981-989.