

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

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

MUDr. Jiří Vachtenheim

2021

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

Školící pracoviště: III. chirurgická klinika 1. LF UK a FN Motol

Školitel: prof. MUDr. Robert Lischke, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
1. Úvod.....	6
1.1 Signální dráha Hedgehog.....	6
1.2 Protein SIVA-1	8
2. Hypotézy a cíle práce.....	10
2.1 Hypotézy	10
2.2 Cíle práce	11
3. Materiál a metodika	12
4. Výsledky	12
4.1 Studium signální dráhy Hedgehog.....	12
4.2 Studium proteinu SIVA-1	13
5. Diskuze	14
6. Závěr	18
7. Použitá literatura	20
8. Vlastní publikace	25

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 Signální dráha 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 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 aktivující 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).

GLI rodina se u obratlovců skládá ze tří proteinů: 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), 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 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).

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 Protein SIVA-1

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.

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.

2. Hypotézy a cíle práce

2.1 Hypotézy

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.

Nedávný výzkum ukázal, 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) (Van Nostrand J. L. et al., 2015). 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

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 inhibítozem 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).
4. 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.
5. Určení mechanismu, jakým je protein SIVA-1 proonkogenní u lidského nemalobuněčného karcinomu plic.
6. Určení exprese proteinu SIVA-1 v panelu lidských buněk nemalobuněčného karcinomu plic a normálních bronchiálních epitelálních buněk.

3. Materiál a metodika

Při realizaci této práce byla využita celá řada molekulárně biologických metod. Tyto metody zahrnují především práci s nádorovými buněčnými liniemi v buněčných kulturách (detailní výčet jednotlivých buněčných linií je uveden v příslušné části disertační práce), Western blot, měření buněčné proliferace, detekce apoptózy, metody s promoter-reporter plazmidy. Soubor vzorků nádorové a příslušné kontrolní zdravé plicní tkáně od 39 pacientů operovaných pro nemalobuněčný karcinom plic na III. chirurgické klinice 1. LF UK a FN Motol byl nashromážděn s písemným souhlasem každého jednotlivého pacienta. V těchto vzorcích byla prováděna ta část výzkumu, která se zabývala významem proteinu SIVA-1 u lidského nemalobuněčného karcinomu plic. Zpracování vzorků je přesně popsáno v příslušné kapitole disertační práce (3.2.2). Z dalších molekulárně biologických metod neuvedených výše byla použita metoda real-time PCR. Metody statistického hodnocení jsou přesně popsány v kapitole 3.1.7 této disertační práce.

4. Výsledky

4.1 Studium signální dráhy Hedgehog

Níže jsou uvedeny nejdůležitější výsledky této části výzkumu. 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.

Byl zkoumána i senzitivita na inhibitor GANT61 (inhibitor transkripčního faktoru GLI, který je konečným efektem signální dráhy Hedgehog) u vybraných nádorových buněčných linií (nemalobuněčný karcinom plic a některé další nádorové linie). Bylo zjištěno, že zkoumané vybrané linie nemalobuněčného karcinomu plic ale také buněčná linie rhabdoidního tumoru, buněčné linie hepatocelulárního karcinomu a tři

buněčné linie karcinomu pankreatu 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).

4.2 Studium proteinu SIVA-1

Do souboru bylo 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. 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). 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 %). Níže jsou uvedeny nejzásadnější výsledky této části práce.

Pomocí metody Western blot bylo zjištěno, že 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, i když zde mohla být přítomna nízká, ale pod úroveň 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. Vzorek získaný od jediného pacienta, který absolvoval před operací neoadjuvantní chemoradioterapii, měl hladinu proteinu přibližně stejnou v nádoru i kontrole. Pomocí metody real-time PCR bylo dále zjištěno, že ve všech analyzovaných vzorcích byla SIVA-1 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.

Pomocí práce s promoter-reporter systémem byl zjištěn zcela nový a originální nález, že SIVA-1 aktivuje promoter pro survivin (cílový antiapoptotický protein pro dráhu Hedgehog), a to jednak bez přidání transkripčních faktorů GLI, jednak i s přidáním transkripčního faktoru GLI1 nebo GLI2. 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. Dále bylo také zjištěno, že SIVA-1 antagonizuje inhibiční účinek inhibitoru GANT61 na Hedgehog dráhu.

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. V naší práci jsme se zabývali studiem významu signální dráhy Hedgehog a proteinu SIVA-1 u nemalobuněčného karcinomu plic. Nejzásadnější výsledky této práce jsou diskutovány níže.

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 některých dalších nádorů. Zjistili jsme, že aktivita signální dráhy Hedgehog v buněčných liniích lidského nemalobuněčného karcinomu plic byla enormně zvýšená. 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

plíc a dalších) k testování inhibice buněčné proliferace inhibitorem Hedghog dráhy (inhibitor GANT61). Zjistili jsme, že vybrané buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic nebyly na konci experimentu citlivé k působení tohoto inhibitoru.

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 myší 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 proapoptický (tedy protinádorový) faktor (podobně jako například BAX, BAD, BAK, PUMA, NOXA), jehož transkripce je (stejně jako u ostatních proapoptických genů) řízena tumor supresorovým genem p53. Protein SIVA-1 však ve všech ostatních tkáních kromě plicní nadále fungoval proapopticky. 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.

U vzorků nádorů a příslušných kontrolních vzorků tumorem nepostíženého 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. 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 myšího 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 neadjuvantní

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.

Následně jsme stanovovali hladinu proteinu SIVA-1 pomocí Western blotu i u buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic a některých dalších typů nádorů. 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. 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 svojí typickou 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 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). 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).

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 kontrolním zdravém plicním 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. 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Peng, T., Frank, D. B., Kadzik, R. S., Morley, M. P., Rathi, K. S., Wang, T., Zhou, S., Cheng, L., Lu, M. M. and Morrissey, 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.

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).

Resch, U., Schichl, Y. M., Winsauer, G., Gudi, R., Prasad, K. and de Martin, R. (2009) 'Siva1 is a XIAP-interacting protein that balances

NFκB and JNK signalling to promote apoptosis', *Journal of cell science*, 122(15), pp. 2651-2661.

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

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

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.

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.

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.

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 obatoclox', *International journal of oncology*, 49(3), pp. 953-960.

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.

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.

8. Vlastní publikace

Publikace, které jsou podkladem disertační práce

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**

Publikace, které nejsou podkladem disertační práce

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