

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Úloha signální dráhy oxysterolů v rozvoji solidních nádorů

The role of oxysterol signaling pathway in the development of solid tumors

Školitel: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 22. 06. 2023

Alžběta Spálenková

Podpis

Identifikační záznam:

Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

SPÁLENKOVÁ, Alžběta. *Úloha signální dráhy oxysterolů v rozvoji solidních nádorů.*

[The role of oxysterol signaling pathway in the development of solid tumors]. Praha, 2023.

Počet stran: 115, Počet příloh: 5. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Státní zdravotní ústav v Praze. Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Klíčová slova: karcinom prsu, oxysterol, exprese, prognóza, 7-ketocholesterol, tamoxifen

Keywords: breast carcinoma, oxysterol, expression, prognosis, 7-ketocholesterol, tamoxifen

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. za veškerý čas, cenné rady a především jeho nekonečnou trpělivost, kterou se mnou během mých studií měl. Poděkování patří také celému týmu Oddělení toxikogenomiky Státního zdravotního ústavu a Laboratoří farmakogenomiky Biomedicínského centra LFP UK, všem kolegům bývalým i současným, především však kolegyni Ing. Marii Ehrlichové za vše, co mě naučila a večery strávené v laboratoři při společném experimentování. Zejména potom děkuji mé nejdražší kolegyni a skvělé kamarádce, Mgr. Karolíně Šeborové, PhD., za to, že hlavně díky ní a její každodenní podpoře jsem zvládla neztratit hlavu a nevzdat to. Děkuji také celé mojí rodině a zejména mému muži Petrovi za jeho bezmeznou trpělivost a pochopení, které se mnou celé ty roky měl.

Poděkování patří též všem externím spolupracovníkům a také grantovým agenturám za nezbytnou finanční podporu. Tato práce byla sponzorována grantovými agenturami: Agentura zdravotnického výzkumu Ministerstva zdravotnictví ČR (AZV), č. projektu NU22-08-00281, Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK), projekt Cooperatio Surgical Disciplines 207043 (program základní institucionální podpory vědy a výzkumu na UK) a projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny – NÚVR (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – financovaným Evropskou unií – Next Generation EU.

Abstrakt

Oxysteroly jsou oxidované deriváty cholesterolu, které hrají významnou roli v patogenezi řady onemocnění, včetně nádorových. Ovlivňují procesy jako je buněčná proliferace, apoptóza, či migrace buněk a mohou také ovlivňovat účinnost některých protinádorových léčiv. Jejich hladina může být rovněž asociována s prognózou onkologických pacientů. Předkládaná dizertační práce shrnuje studie, které na různých úrovních rozšiřují znalosti o významu oxysterolů u karcinomu prsu.

V první studii jsme se zaměřili na analýzu genové exprese klíčových faktorů signální dráhy oxysterolů na prognózu pacientek s estrogen receptor (ER) pozitivním typem karcinomu prsu. V rámci výsledků této analýzy jsme odhalili souvislost exprese některých genů s klinicko-patologickými daty pacientek, jako je například stádium dle TNM klasifikace, či stupeň diferenciacie onemocnění. Dále jsme odhalili asociaci mezi expresí genu *ABCG2* a bezpříznakovým přežíváním pacientek. Avšak pro ostatní geny bude jejich případný prognostický potenciál vyžadovat ověření na rozsáhlejší kohortě pacientek.

Druhá studie měla za úkol stanovení hladiny sedmi oxysterolů v plasmě pacientek s ER pozitivním karcinomem prsu. Výsledkem této studie byla asociace hladiny některých oxysterolů s velikostí, či stádiem nádoru. Vyšší hladina cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triolu byla potom asociována s horší prognózou a kratším bezpříznakovým přežíváním pacientek, zejména u skupiny léčené pouze tamoxifenem.

Poslední studií této dizertační práce byla *in vitro* analýza zaměřená na vliv 7-ketocholesterolu na ER pozitivní i ER negativní buněčné linie karcinomu prsu. V tomto případě jsme zjistili, že 7-ketocholesterol může ovlivňovat účinnost tamoxifenu v závislosti na ER pozitivitě/negativitě buněčné linie a dále také migrační potenciál studovaných buněčných linií bez ohledu na jejich ER status. Analýza genové exprese ukázala na odlišnou regulaci enzymu *CYP11B1*, která byla následně potvrzena také na proteinové úrovni.

Výstupy této dizertační práce tak přináší nové poznatky o prognostickém potenciálu exprese genů oxysterolové dráhy, či rozšiřují dosavadní poznatky vztahu mezi hladinou oxysterolů a např. přežíváním pacientek s karcinomem prsu. Ukazují také dosud nepopsaný účinek 7-ketocholesterolu, jehož role může být významná v hormonální terapii karcinomu prsu a který je kandidátním oxysterolem pro navazující studie.

Abstract

Oxysterols are oxidized derivatives of cholesterol that play an important role in the pathogenesis of many diseases, including cancer. They affect processes such as cell proliferation, apoptosis, and cell migration and may also influence the efficacy of some anticancer drugs. Their levels may also be associated with the prognosis of cancer patients. The present thesis summarizes studies that expand the knowledge on the importance of oxysterols in breast cancer at different levels.

In the first study, we analyzed gene expression of key factors of the oxysterol signaling pathway on the prognosis of patients with estrogen receptor (ER)-positive breast cancer. The results of this analysis revealed the association of the expression of some genes with clinicopathological data of patients, such as tumor stage (according to TNM classification) or the tumor grade. Furthermore, we revealed an association between *ABCG2* gene expression and disease free survival of patients. However, for other genes, the prognostic potential will require validation in a larger cohort of patients.

The second study was designed to determine plasma levels of seven oxysterols in patients with ER-positive breast cancer. This study resulted in an association of the levels of different oxysterols with tumor size or stage. Higher levels of cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol were then associated with worse prognosis and shorter disease free survival in patients, especially in the tamoxifen-only treated group.

The last study of this thesis was an *in vitro* analysis focused on the effect of 7-ketocholesterol on ER positive and ER negative breast cancer cell lines. In this case, we found that 7-ketocholesterol can influence the efficacy of tamoxifen regarding the ER positivity/negativity of the cell line and also the migratory potential of the studied cell lines regardless of their ER status. Gene expression analysis revealed a different regulation of the *CYP11B1* enzyme, which was then also validated at the protein level.

This thesis thus provides new insights into the prognostic potential of gene expression of the oxysterol pathway or extend the existing knowledge of the relationship between oxysterol levels and e.g. survival of breast cancer patients. It also shows a previously unpublished effect of 7-ketocholesterol, which may have a role in hormonal therapy of breast cancer and is an interesting candidate for our future studies.

Obsah

Seznam zkratk	9
1. Literární přehled	12
1.1. Oxysteroly	12
1.1.1. Fyziologický význam oxysterolů	13
1.1.1.1 Oxysteroly a metabolismus a transport cholesterolu	13
1.1.1.2 Oxysteroly a signální dráhy	14
1.1.1.3 Oxysteroly a aktivita membránových proteinů	15
1.1.1.4 Oxysteroly, buněčné membrány a vezikulární transport	16
1.2. Význam oxysterolů v patologických stavech	16
1.3. Oxysteroly a nádorová onemocnění	19
1.3.1. Buněčná viabilita, proliferace a smrt	19
1.3.1.1 27-hydroxycholesterol	19
1.3.1.2 25-hydroxycholesterol	23
1.3.1.3 7-ketocholesterol	26
1.3.1.4 7 β -hydroxycholesterol	28
1.3.1.5 Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol	29
1.3.1.6 5 α ,6 α -epoxycholestanol a 5 β ,6 β -epoxycholestanol	30
1.3.1.7 Ostatní oxysteroly	30
1.3.2 Buněčná migrace a invazivita	31
1.3.3 Oxysteroly a imunitní systém	34
1.3.4. Oxysteroly a protinádorová terapie	35
1.3.4.1 Hormonální terapie	36
1.3.4.2 Chemoterapie	36
1.3.4.3 Imunoterapie	39
1.3.4.4 Radioterapie	40
1.3.5. Hladiny oxysterolů u onkologických pacientů	40
2. Cíle práce	44
3. Materiály a metody	46
3.1 Vzorky plasmy a tkání od patientek s karcinomem prsu	46
3.1.1 Klinicko-patologická data	46
3.2 Homogenizace tkání a izolace RNA z tkání patientek s karcinomem prsu	49
3.3 Měření koncentrace, kontrola kvality vzorků, syntéza cDNA	50
3.4 Stanovení genové exprese	50
3.5 Příprava vzorků plasmy a extrakce oxysterolů	51

3.6 Stanovení hladiny oxysterolů pomocí hmotnostní spektrometrie	51
3.7 Buněčné kultury.....	52
3.8 Analýza stability 7-ketocholesterolu v kultivačním médiu	52
3.9 Stanovení buněčné viability a proliferace	53
3.10 Analýza kaspázové aktivity	54
3.11 Studium změn v buněčném cyklu.....	54
3.12 Analýza buněčné migrace a invazivity	54
3.13 Příprava vzorků z buněčných linií pro stanovení genové exprese.....	55
3.14 Western blotting	56
3.15 Statistická analýza dat	57
4. Výsledky.....	60
4.1 Rozdíly v genové expresi u pacientek s karcinomem prsu (Kloudova <i>et al.</i> 2017)	60
4.1.1 Charakteristika patientské kohorty	60
4.1.2 Rozdíly v genové expresi mezi ER pozitivními a ER negativními karcinomy prsu	62
4.1.3 Vztahy genové exprese ke klinicko-patologickým údajům pacientek.....	64
4.1.4 Detekce změn na úrovni proteinu v tkáních pacientek	69
4.2 Rozdíly hladiny oxysterolů v cirkulaci u pacientek s karcinomem prsu (Kloudova- Spalenkova <i>et al.</i> 2020)	71
4.2.1 Charakteristika patientské kohorty	71
4.2.2 Detekované hladiny oxysterolů.....	72
4.2.3 Porovnání s klinicko-patologickými daty	73
4.3 <i>In vitro</i> studie vlivu 7-ketocholesterolu na účinnost tamoxifenu (Spalenkova <i>et al.</i> , nepublikovaná data – přijato k publikaci)	76
4.3.1. Stabilita 7-ketocholesterolu v kultivačním médiu	76
4.3.2 Změny buněčné viability a proliferace v přítomnosti tamoxifenu, 7-KC a jejich kombinace	77
4.3.3 Změny na úrovni buněčného cyklu.....	79
4.3.4 Změny buněčné migrace a invazivity v přítomnosti 7-ketocholesterolu.....	80
4.3.5 Změny na úrovni genové exprese	82
4.3.6 Změny na úrovni exprese proteinu	86
5. Diskuze.....	88
6. Závěr.....	99
7. Seznam publikací	100
8. Seznam literatury.....	102
9. Seznam příloh.....	115

Seznam zkratek

α -EC	5 α ,6 α -epoxycholestanol	5 α ,6 α -epoxycholestanol
β -EC	5 β ,6 β -epoxycholestanol	5 β ,6 β -epoxycholestanol
20-HC	20-hydroxycholesterol	20-hydroxycholesterol
22(R)-HC	22(R)-hydroxycholesterol	22(R)-hydroxycholesterol
24-HC	24-hydroxycholesterol	24-hydroxycholesterol
25-HC	25-hydroxycholesterol	25-hydroxycholesterol
27-HC	27-hydroxycholesterol	27-hydroxycholesterol
4 α -HC	4 α -hydroxycholesterol	4 α -hydroxycholesterol
4 β -HC	4 β -hydroxycholesterol	4 β -hydroxycholesterol
7-KC	7-ketocholesterol	7-ketocholesterol
7 α -HC	7 α -hydroxycholesterol	7 α -hydroxycholesterol
7 β -HC	7 β -hydroxycholesterol	7 β -hydroxycholesterol
ABC	ATB-binding cassette	transportní protein (pumpa) ABC
AEBS	antiestrogen-binding sites	antiestrogen vazebná místa
BCRP	breast cancer resistance protein	triviální název transportéru ABCG2
CDX	cell line-derived xenograft	nádorový xenotransplantát odvozený od buněčné linie
CT	cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol
CYP	cytochrome P450	cytochrom P450
D8D7I	3 β -hydroxysterol- Δ 8- Δ 7-isomerase	3 β -hydroxysterol- Δ 8- Δ 7- izomeráza
DCIS	ductal carcinoma <i>in situ</i>	duktální karcinom <i>in situ</i>
DDA	dendrogenin A	dendrogenin A
DFS	disease-free survival	bezpříznakové přežívání
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	7-dehydrocholesterol reduktáza
DM	diabetes mellitus	diabetes mellitus
EBP	emopamil binding protein	emopamil vázající protein
EMT	epithelial-mesenchymal transition	epiteliální-mezenchymální tranzice
EndMT	endothelial-mesenchymal transition	endoteliální-mezenchymální tranzice
ER (α/β)	estrogen receptor (α/β)	estrogenový receptor (α/β)
ER-	ER negative	ER negativní
ER+	ER positive	ER pozitivní
ERK	extracellular signal-regulated kinase	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FC	fold change	míra změny genové exprese
FDR	false discovery rate	korekce pro mnohočetné testování
GC	gass chromatography	plynová chromatografie
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2
Hh	Hedgehog (signaling)	Hedgehog (signalizace)

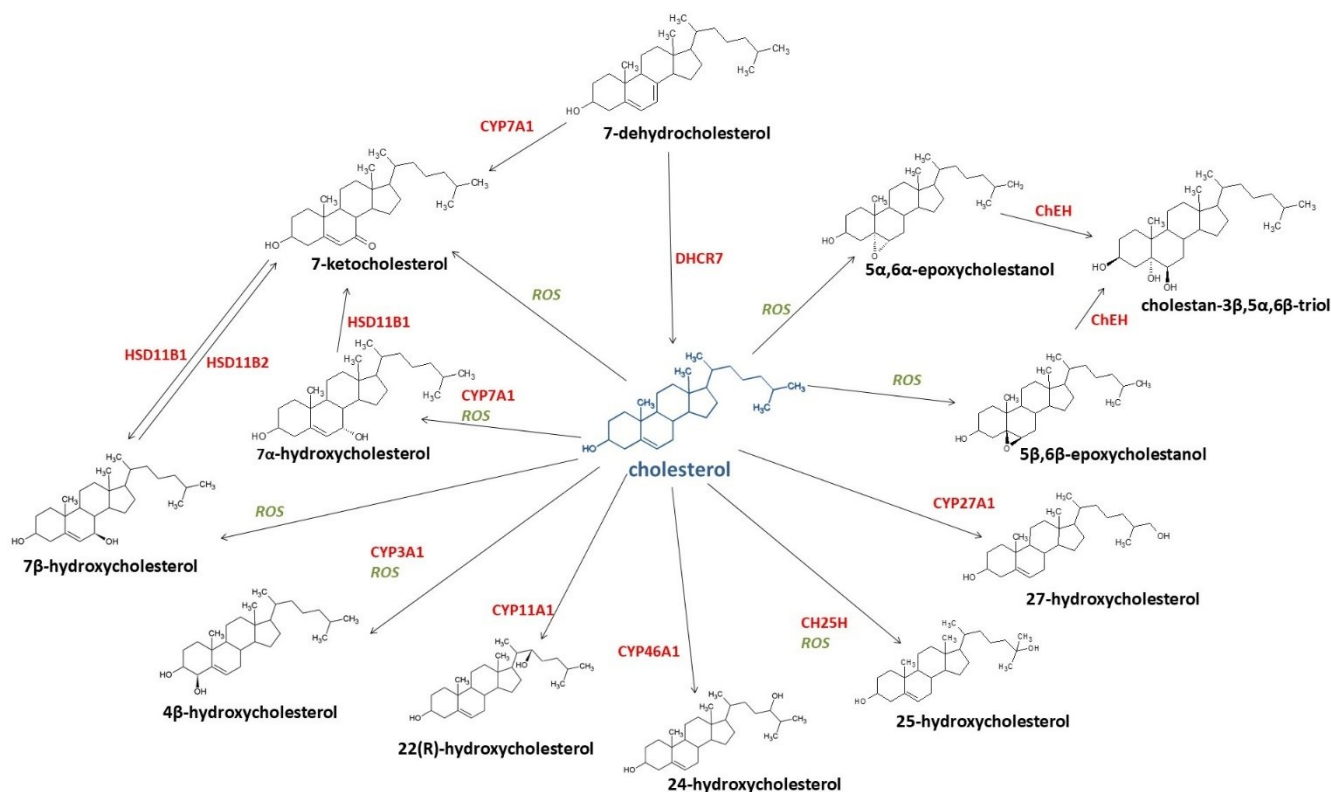
HMG-CoA	3-hydroxy-3methyl-glutaryl-CoA	3-hydroxy-3methyl-glutaryl-CoA
HMGCR	3-hydroxy-3methyl-glutaryl-CoA) reductase	3-hydroxy-3methyl-glutaryl-CoA) reduktáza
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	endoteliální buňky lidské pupečnickové žíly
IDC	invasive ductal carcinoma	invazivní duktální karcinom
ILC	invasive lobular carcinoma	invazivní lobulární karcinom
LC	liquid chromatography	kapalinová chromatografie
Insig	insulin-induced gene	inzulinem indukovaný gen
LCIS	lobular carcinoma <i>in situ</i>	lobulární karcinom <i>in situ</i>
LDL	low density lipoprotein	lipoprotein o nízké hustotě
LDLR	low density lipoprotein receptor	receptor LDL
LXR	liver X receptor	játerní X receptor
MAPK	mitogen activated protein kinase	mitogenem aktivovaná protein kináza
MIQE	The Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments	Minimální informace pro zveřejnění experimentů qPCR v reálném čase
MMP	matrix metaloproteinase	matrix metaloproteináza
MS	mass spectrometry	hmotnostní spektrometrie
NFW	nuclease-free water	voda bez přítomnosti nukleáz
NPC	Niemann-Pick disease type C	Niemann-Pickova choroba typu C
OHD	OSBP homology domain	OSBP homologní doména
ORP	OSBP-related proteins	protein příbuzný s OSBP
OSBP	oxysterol-binding proteins	oxysterol vazebný protein
OSBPL	OSBP-like proteins	protein podobný OSBP
PARP	poly(ADP-ribozo)polymerase	poly(ADP-ribozo)polymeráza
PKB	protein-kinase B	proteinkináza B
PR	progesterone receptor	progesteronový receptor
PXR	pregnane X receptor	pregnanový X receptor
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
ROS	reactive oxygen species	reaktivní kyslíkové radikály
RXR	retinoid X receptor	retinoidní X receptor
SCAP	SREBP-cleavage activating protein	protein, který aktivuje štěpení SREBP
SERM	selective estrogen receptor modulator	selektivní modulátor estrogenových receptorů
SLOS	Smith-Lemli-Opitz syndrom	Smith-Lemli-Opitz syndrom
SRE	sterol regulatory elements	místa pro vazbu faktorů SREBP
SREBP	sterol regulatory element binding proteins	transkripční faktor ovlivňující hladinu sterolů
SSD	sterol sensing domain	doména citlivá na přítomnost sterolů
TAM	tamoxifen	tamoxifen
TAM+7-KC	tamoxifen and 7-ketocholesterol	kombinace tamoxifenu a 7-KC

TLR2/4	toll-like receptor 2/4	membránové receptory z rodiny TLR
TNBC	triple-negative breast carcinoma	ER, PR a HER2 negativní karcinom prsu
YES	yeast-reporter system	kvasinkový reportérový systém

1. Literární přehled

1.1. Oxysteroly

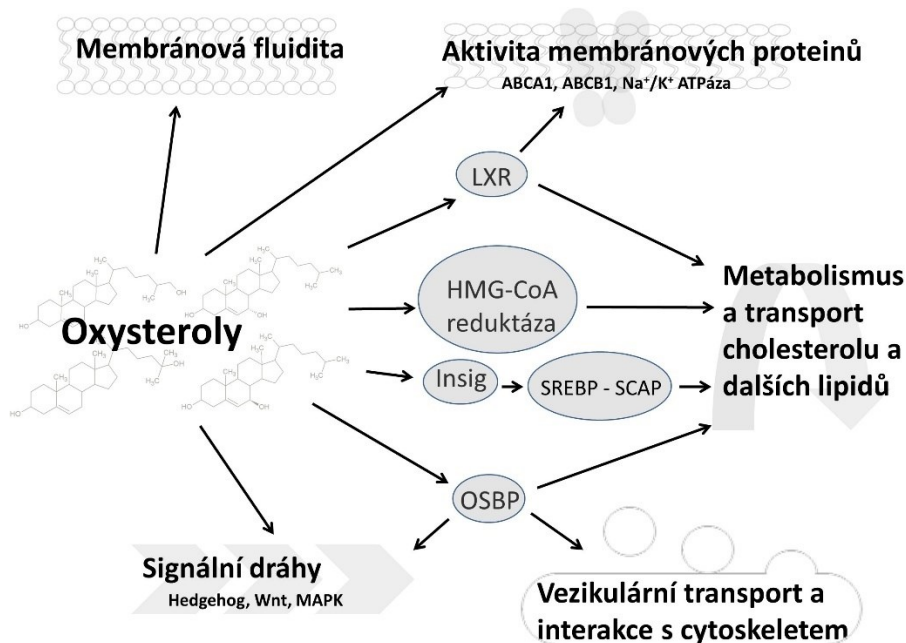
Oxysteroly jsou oxidované deriváty cholesterolu, které se v nízkých koncentracích přirozeně vyskytují v lidském organismu. Mohou vznikat jednak neenzymatickou cestou prostřednictvím reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, z angl. reactive oxygen species), ale také oxidací cholesterolu pomocí enzymů, nejčastěji z rodiny cytochromů P450 (CYP), kde vznikají jako meziprodukty syntézy žlučových kyselin a steroidních hormonů (podrobněji shrnuto v přehledovém článku Hajeyah *et al.* (Hajeyah *et al.* 2020). Některé oxysteroly mohou vznikat enzymatickou i neenzymatickou cestou (Obrázek 1). Oxysteroly mohou být oxidované jak na sterolovém jádru (4 β -hydroxycholesterol, 4 β -HC; 7 α -hydroxycholesterol, 7 α -HC; 7 β -hydroxycholesterol, 7 β -HC; 7-ketocholesterol, 7-KC; 5 α ,6 α -epoxycholestanol, α -EC; 5 β ,6 β -epoxycholestanol, β -EC; cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol, CT), tak na postranním řetězci (22(R)-hydroxycholesterol, 22(R)-HC; 24-hydroxycholesterol, 24-HC; 25-hydroxycholesterol, 25-HC; 27-hydroxycholesterol, 27-HC).



Obrázek 1: Struktura a vznik nejběžnějších oxysterolů. Oxysteroly mohou vznikat neenzymatickou cestou prostřednictvím reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), či enzymatickou cestou prostřednictvím enzymů z rodiny cytochromů P450 (CYP), či cholesterol 25-hydroxylázy (CH25H). Některé oxysteroly mohou vznikat oběma zmíněnými způsoby a další pak mohou být konvertovány mezi sebou pomocí 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáz (HSD11). Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol je potom tvořen prostřednictvím cholesterol-5,6-oxid hydrolázové aktivity (ChEH). Obrázek upraven a doplněn podle Kloudova-Spalenkova *et al.* (Kloudova-Spalenkova *et al.* 2020).

1.1.1. Fyziologický význam oxysterolů

Ačkoli se v lidském těle vyskytují v nízkých koncentracích (hladiny jednotlivých oxysterolů v cirkulaci se pohybují mezi 0,1 ng – 0,1 mg/ml plasmy), hrají oxysteroly řadu významných rolí v různých fyziologických procesech (Obrázek 2), které budou podrobněji představeny v této kapitole.



Obrázek 2: Význam oxysterolů v buňce. Přítomnost oxysterolů ovlivňuje řadu důležitých fyziologických procesů, jako je metabolismus a transport cholesterolu a dalších lipidů, vezikulární transport, aktivita některých transmembránových proteinů, dále mohou ovlivňovat fluiditu membrán a také některé signální dráhy. Oxysteroly mohou tyto procesy ovlivňovat jak přímo, tak skrze další proteiny, jako např. LXR, Insig, HMG-CoA reductázy, či proteiny z rodiny OSBP. Upraveno podle Kloudova *et al.* (Kloudova *et al.* 2017).

1.1.1.1 Oxysteroly a metabolismus a transport cholesterolu

Oxysteroly se svou přítomností v buňce podílejí na metabolismu cholesterolu, a to hned několika různými způsoby. Prvním z těchto způsobů je ovlivnění aktivace proteinů SREBP (z angl. sterol regulatory element binding proteins) (Wang *et al.* 1993). Tyto proteiny jsou transkripčními faktory, které jsou za normální hladiny cholesterolu v buňce lokalizovány na endoplasmatickém retikulu, kde tvoří komplex s proteinem SCAP (z angl. SREBP-cleavage activating protein). Na SSD doménu (z angl. sterol sensing domain) proteinu SCAP je dále vázán protein Insig (z angl. insulin-induced gene) (Yang *et al.* 2002). Pokud hladina cholesterolu v buňce poklesne, je protein Insig ubiquitínován a komplex SREBP-SCAP je následně translokován do Golgiho aparátu, kde je rozštěpen a transkripční faktor SREBP putuje do jádra, váže se na SRE elementy (z angl. sterol regulatory elements) v promotorech

příslušných genů (Wang *et al.* 1993). Těmi jsou například geny kódující některé klíčové enzymy syntézy cholesterolu, nebo gen pro LDL (z angl. low density lipoprotein) receptor. Tato regulační dráha může být ovlivněna jak samotným cholesterolem, který interaguje s proteinem SCAP, tak i oxysteroly, které interagují s proteinem Insig (Radhakrishnan *et al.* 2007). Skrze SSD doménu a vazbu proteinu Insig mohou oxysteroly dále ovlivňovat hladinu HMG-CoA (3-hydroxy-3methyl-glutaryl-CoA) reductázy (HMGCR), která je jedním z klíčových enzymů syntézy cholesterolu. Vazba proteinu Insig způsobuje zvýšenou degradaci tohoto proteinu v proteazomu (Sever *et al.* 2003a; Sever *et al.* 2003b; Song and DeBose-Boyd 2004).

Další možností, jak mohou oxysteroly ovlivňovat metabolismus cholesterolu a dalších lipidů, je působení skrze oxysterol-vazebné proteiny (OSBP, z angl. oxysterol-binding proteins), některé z nich nazývané někdy také jako ORP (z angl. OSBP-related proteins), nebo OSBPL (z angl. OSBP-like proteins). Tuto rodinu proteinů tvoří v současné době nejméně 12 členů (Jaworski *et al.* 2001), které se vyznačují OHD (z angl. OSBP homology domain) doménou, která je schopná na sebe vázat oxysteroly a také některé fosfolipidy. OSBP proteiny se vyskytují nejčastěji v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu, kde se mimo jiné účastní regulace metabolismu a transportu cholesterolu. Kromě toho také ovlivňují aktivitu proteinů SREBP, jak bylo popsáno například pro protein ORP8 (Zhou *et al.* 2011).

Jaterní X receptory, LXR (z angl. liver X receptor) jsou další skupinou proteinů, jejichž aktivita je ovlivněna přítomností oxysterolů a jejichž působení ovlivňuje metabolismus a transport cholesterolu. Jaterní X receptory fungují jako transkripční faktory, které v heterodimeru s retinoidními X receptory, RXR (Willy *et al.* 1995), ovlivňují expresi transportérů z rodiny ABC (z angl. ATB-binding cassette), které mají na svědomí membránový transport cholesterolu a dalších steroidních molekul. Jsou jimi kupříkladu transportéry ABCA1 (Costet *et al.* 2000; Venkateswaran *et al.* 2000), ABCG1 (Venkateswaran *et al.* 2000), ABCG5, či ABCG8 (Repa *et al.* 2002). O komplexnosti systému regulace metabolismu a transportu cholesterolu svědčí zjištění, že pro správnou expresi genů regulovaných LXR/RXR heterodimery je také potřeba protein z rodiny OSBP, konkrétně protein ORP2 (Escajadillo *et al.* 2016).

1.1.1.2. Oxysteroly a signální dráhy

Přítomnost oxysterolů v buňkách ovlivňuje také některé signální dráhy. Příkladem takovéto signální dráhy je MAPK (z angl. mitogen activated protein kinase) dráha. Studie prokázaly aktivaci ERK (extracellular signal-regulated kinase) kináz této dráhy v přítomnosti 7 β -HC, či 25-HC (Ares *et al.* 2000). Kromě toho může být aktivita ERK regulovaná také skrze

proteiny OSBP, kupříkladu u proteinu OSBP1 bylo prokázáno ovlivnění aktivity ERK1/2 kináz skrze regulaci jejich fosforylace (Wang *et al.* 2005).

Dalším příkladem signální dráhy ovlivněné oxysteroly je dráha Sonic hedgehog (Hh), která hraje roli zejména v embryonální fázi vývoje (Carballo *et al.* 2018). Odborné studie v minulosti potvrdily, že oxysteroly, zejména ty oxidované na postranním řetězci, jsou schopné vázat se na protein Smoothed, který je součástí této signální dráhy, aktivovat jej a tímto způsobem přispívat ke zvýšené buněčné proliferaci. Tento efekt byl pozorován kupříkladu u 20-hydroxycholesterolu (20-HC), či 25-HC (Corcoran and Scott 2006). Také Wnt signální dráha, uplatňující se zejména během vývoje, může být regulována přítomností oxysterolů oxidovaných na postranním řetězci. V tomto případě bylo toto zjištění učiněno pro 22(R/S)-hydroxycholesterol a 20(S)-HC (Kha *et al.* 2004).

Mezi signalizace související s působením oxysterolů patří také signální dráha PI3K/mTOR – kupříkladu aktivace transportního proteinu ABCB1 je zprostředkována skrze aktivaci dráhy mTOR (Wang *et al.* 2013). Působení oxysterolů, v tomto případě 7-KC a 25-HC bylo v literatuře spojeno také se signalizací Akt/PKB (protein-kináza B). Přítomnost těchto oxysterolů souvisela s degradací PKB a indukcí buněčné smrti (Rusiñol *et al.* 2004).

1.1.1.3 Oxysteroly a aktivita membránových proteinů

Neméně významnou úlohou oxysterolů je jejich schopnost regulovat aktivitu některých transmembránových proteinů. Jeden z příkladů – ovlivnění exprese ABCA1 oxysteroly skrze LXR/RXR heterodimer – byl popsán v kapitole 1.1.1.1, avšak navíc byla zjištěna modulace jeho aktivity ovlivněním přímé interakce protein-protein mezi LXR a transportérem ABCA1 (Hozoji *et al.* 2008). Po vazbě oxysterolu dochází k disociaci proteinu LXR z transportéru ABCA1 a tím k aktivaci tohoto transportéru. Jiným příkladem z rodiny ABC transportérů je protein ABCB1 nazývaný také jako P-glykoprotein. V případě tohoto transportéru pozorovali autoři studie zvýšenou stabilitu proteinu a také stimulaci transportu jeho substrátů v přítomnosti 7-KC (Wang *et al.* 2013).

Na⁺/K⁺ ATPáza patří mezi další transmembránové proteiny, jejichž aktivitu ovlivňuje přítomnost oxysterolů. Na modelu lidských endoteliálních buněk bylo prokázáno, že přítomnost 7-KC snižuje expresi $\alpha 1$ -podjednotky této ATPázy (Duran *et al.* 2010). K podobnému zjištění dospěli také autoři starší studie, popisující 32% snížení aktivity Na⁺/K⁺ ATPázy v králičích buňkách hladkého svalstva aorty v přítomnosti CT. K mírnému snížení (o 8 %) došlo také v přítomnosti 25-HC, avšak toto snížení nebylo statisticky významné (Peng *et al.* 1985). K podobnému zjištění dospěli také autoři sledující další transmembránový protein, Ca²⁺/Mg²⁺

ATPázu, jejíž aktivita byla snížena v bovinních buňkách hladkého svalstva aorty v přítomnosti 25-HC (Zhou *et al.* 1991).

1.1.1.4. Oxysteroly, buněčné membrány a vezikulární transport

Fluidita je důležitou vlastností buněčných membrán. Míra fluidity membrány závisí na jejím složení – obsahu fosfolipidů, délce řetězce mastných kyselin, míře nenasycených vazeb, a také přítomnost molekul cholesterolu, který může tvořit až 20 - 25 % obsahu buněčných membrán a jehož přítomnost jejich fluiditu snižuje (Ikonen 2008). Není tedy zcela překvapivé, že i oxysteroly se mohou inkorporovat do buněčných membrán a ovlivňovat jejich fluiditu, či permeabilitu. Navíc mohou podporovat, či naopak narušovat tvorbu membránových mikrodomén (tzv. membránových raftů). Konkrétní účinky potom závisí na jednotlivých oxysterolech (Massey and Pownall 2005; Rooney *et al.* 1986; Theunissen *et al.* 1986). Například 7-KC způsobuje vyšší rigiditu membrán v buněčné linii HUVEC (z angl. human umbilical vein endothelial cells), než cholesterol (Duran *et al.* 2010). Inkubace buněk se 7 β -HC také způsobuje zvýšení fluidity membrán, jak bylo prokázáno na buněčné kultuře primárních astrocytů (Kupferberg *et al.* 1991). Skrze ovlivnění struktury a fluidity buněčných membrán ovlivňují oxysteroly mj. aktivitu transmembránových proteinů popsanou v předchozí kapitole 1.1.1.3.

Přítomnost oxysterolů může ovlivňovat také buněčný transport, kupříkladu mohou ovlivňovat asociaci apolipoproteinu AI s membránou. Tato asociace je stimulována α -EC, β -EC a 24-HC, ale naopak inhibována 7 β -HC, 25-HC a 27-HC (Massey and Pownall 2005). Vezikulární transport může být dále ovlivňován skrze proteiny z rodiny OSBP (Lehto and Olkkonen 2003; Wyles *et al.* 2002).

1.2. Význam oxysterolů v patologických stavech

Kromě výše zmíněných úloh za fyziologických podmínek hrají oxysteroly svou roli také v řadě patologických stavů, mezi které patří onemocnění kardiovaskulární, metabolická, neurodegenerativní či nádorová. Pro oxysteroly jsou nejtypičtějšími účinky stimulace oxidativního stresu a prozánětlivé působení. Pro řadu onemocnění mohou oxysteroly sloužit jako biomarkery pro diagnostiku nebo sledování progresu daného onemocnění (Zmyslowski and Szterk 2019).

Mezi nemoci spojované s přítomností oxysterolů patří ateroskleróza, chronické onemocnění (tzv. kornatění) tepen způsobené akumulací cholesterolu a dalších lipidů v cévní

stěně. Mezi tyto lipidy patří také oxysteroly, jejichž hladina v aterosklerotických placích je až 45krát vyšší, než ve zdravých cévách (Iuliano *et al.* 2003). Přítomnost některých oxysterolů může navíc přispívat k progresi onemocnění, např. 27-HC napomáhá rozvoji aterosklerózy skrze aktivaci prozánětlivých procesů (Umetani *et al.* 2014). Dalším oxysterolem studovaným v souvislosti s aterosklerózou je 7 β -HC, jehož zvýšená hladina v cirkulaci slouží jako prediktivní biomarker progresu aterosklerózy karotid (Salonen *et al.* 1997). Vyšší hladina 7 β -HC souvisí také se zvýšenou peroxidací lipidů a vyšším rizikem dalších kardiovaskulárních patologií, jako je ischemická choroba srdeční (Rimner *et al.* 2005; Ziedén *et al.* 1999). Podobné výsledky byly získány při studiu 7-KC a β -EC, jejichž zvýšená hladina rovněž významně přispívá k riziku kardiovaskulárních chorob a úmrtí v důsledku ischemické choroby srdeční (Rimner *et al.* 2005; Song *et al.* 2017).

Přítomnost oxysterolů je spojována také s některými metabolickými poruchami. U pacientů s *diabetes mellitus* (DM) byla v séru naměřena až 20krát vyšší koncentrace oxysterolů v porovnání se zdravými jedinci, jmenovitě byla signifikantně zvýšená hladina 7 α -HC, 7 β -HC, 7-KC, α -EC a β -EC (Vaya *et al.* 2011). Ke stejnému závěru došla také studie, která zjistila zvýšení celkové hladiny oxysterolů kromě pacientů s DM také u pacientů s hypertriglycerolemií, hypertenzí, či nadváhou/obezitou v porovnání se zdravými jedinci. Při porovnání hladin jednotlivých oxysterolů se potom jako signifikantně zvýšené u hypertenze a DM ukázaly 7 α -HC, 7 β -HC a 7-KC, v případě nadváhy/obezity to potom byl pouze 7 α -HC (Menéndez-Carreño *et al.* 2011). Ke srovnatelným výsledkům dospěla i další studie, která zjistila zvýšenou hladinu 7-KC a CT u diabetiků ve srovnání se zdravými jedinci. Autoři navrhli tyto dva oxysteroly jako možné biomarkery oxidativního stresu u tohoto onemocnění (Samadi *et al.* 2019). V souvislosti s DM jsou jako potenciální terapeutický cíl studovány také LXR receptory (Steffensen and Gustafsson 2006). Vzhledem ke všem výše popsaným stavům, jako je obezita, hypertenze, ateroskleróza, nebo hypercholesterolemie, jsou oxysteroly spojovány s tzv. metabolickým syndromem, ve který tyto komplikace často vyústí.

Další velkou skupinou jsou onemocnění neurodegenerativní, která jsou v souvislosti s oxysteroly intenzivně studována. Vědeckých prací na toto téma existuje mnoho, ale vzhledem k tématu této dizertační práce zde budou zmíněny jen velmi stručně. Oxysterolem, který je v tomto kontextu nejvíce studován, je 24-HC, jehož tvorba probíhá zejména v mozku a který bývá jinak také nazýván cerebrosterol (Lütjohann *et al.* 1996). Změny jeho hladiny v mozkomíšním moku a/nebo cirkulaci jsou spojeny s řadou neurodegenerativních poruch, protože počet zdravých neuronálních buněk je pro jeho tvorbu stěžejní a pokles jeho hladiny tedy přímo úměrně odpovídá mozkové atrofii. Snížená hladina 24-HC je tak spojena například

s pozdními fázemi relaps-remitentní i primárně progresivní formy roztroušené sklerózy, s Huntingtonovou chorobou, Alzheimerovou chorobou, či Parkinsonovou chorobou, jak je podrobněji shrnuto v přehledovém článku Leoni a Caccia (Leoni and Caccia 2011). Kromě 24-HC dochází u neurodegenerativních onemocnění ke změnám hladiny dalších oxysterolů. U pacientů s Alzheimerovou chorobou a roztroušenou sklerózou dochází ke zvýšení hladiny 27-HC v mozkomíšním moku, kde tato zvýšená hladina značí narušení hematoencefalické bariéry (Leoni and Caccia 2011). Zmíněné oxysteroly mohou navíc přispívat k progresi onemocnění – 24-HC i 27-HC zvyšují β -amyloidogenezí, která souvisí s rozvojem Alzheimerovy choroby, v neuronálních buňkách *in vitro* (Gamba *et al.* 2014).

Mezi další onemocnění související s oxysteroly patří věkem podmíněná makulární degenerace, závažné onemocnění sítnice vedoucí až k nevratné ztrátě zraku. K rozvoji tohoto onemocnění může přispívat řada oxysterolů, např. 7-KC, 24-HC nebo 27-HC, zejména stimulací oxidativního stresu, chronického zánětu a indukci buněčné smrti (Zarrouk *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2021). Mezi onemocnění zraku se dále řadí šedý zákal, kde oxysteroly rovněž spolupůsobí. Ve vzorcích od pacientů s tímto onemocněním byly nalezeny 7 β -HC, 7-KC, α -EC, 20-HC, či 25-HC, zatímco u zdravých jedinců nebyla hladina těchto oxysterolů měřitelná (Girão *et al.* 1998).

Oxysteroly hrají roli také u geneticky podmíněných onemocnění, jakými jsou Smith-Lemli-Opitz syndrom (SLOS) a Niemann-Pickova choroba typu C (NPC). SLOS je autozomálně recesivně dědičné onemocnění, které spočívá v mutaci genu pro 7-dehydrocholesterol reductázu (DHCR7). Tento enzym zprostředkovává redukci 7-dehydrocholesterolu na cholesterol a díky mutaci genu *DHCR7* tedy dochází k hromadění 7-dehydrocholesterolu v organismu. Toto hromadění provází řada příznaků, mezi něž patří mentální a růstová retardace, mikrocefalie, šedý zákal a řada dalších (Kelley and Hennekam 2000). NPC je rovněž autozomálně recesivně dědičná porucha, která postihuje transmembránové proteiny NPC1 a NPC2 a v důsledku které dochází k poruše transportu cholesterolu a dalších lipidů a jejich hromadění v tkáních. Mezi projevy této nemoci patří ataxie a demence (Ory 2000). Oxysteroly mohou v případě obou zmíněných nemocí sloužit jako biomarkery (Björkhem *et al.* 2014; Boenzi *et al.* 2016; Porter *et al.* 2010; Xu *et al.* 2011).

Dalším onemocněním je osteoporóza. Bylo zjištěno, že zatímco některé oxysteroly stimulují diferenciaci osteoblastů (22-HC) skrze MAPK, nebo Hh signální dráhy, jiné oxysteroly (CT, 27-HC) působí v opačném směru, tj. inhibují diferenciaci osteoblastů, nebo zvyšují tvorbu osteoklastů (Nelson *et al.* 2013b; Zarrouk *et al.* 2014). Oxysteroly jsou okrajově spojeny také s mužskou neplodností. Ve spermatu neplodných mužů byla zjištěna

mnohonásobně zvýšená koncentrace 7 β -HC a 7-KC v porovnání s fertilními jedinci (Garolla *et al.* 2018).

Velkou skupinou chorob, kde hraje přítomnost oxysterolů významnou roli, jsou nádorová onemocnění. Působení oxysterolů na nádorové buňky, změny hladin oxysterolů u pacientů s nádorovým onemocněním a také vliv přítomnosti oxysterolů na účinnost protinádorové terapie budou detailně popsány v následující kapitole.

1.3. Oxysteroly a nádorová onemocnění

Význam oxysterolů byl prokázán u řady nádorových diagnóz. Nejlépe prostudovaným je v současné době stále karcinom prsu, nicméně velká řada studií byla publikována i o dalších malignitách. Mezi ty patří karcinom plic, prostaty, žlučníku a žlučových cest, kolorektální a hepatocelulární karcinom, nebo glioblastom. Zmínky lze v literatuře najít také pro neuroendokrinní nádor pankreatu, ovariální karcinom, melanom, lymfomy a leukemie, jak je shrnuto v přehledové publikaci Kloudova *et al.* (Kloudova *et al.* 2017). U těchto nádorových onemocnění bylo prokázáno ovlivnění buněčné proliferace, migrace a invazivity nádorových buněk, nebo buněčné smrti v přítomnosti jednotlivých oxysterolů. Skrze tyto mechanismy mohou mít oxysteroly vliv mimo jiné na nádorovou progresi. Účinky jednotlivých oxysterolů jsou podrobněji rozebrány níže.

1.3.1. Buněčná viabilita, proliferace a smrt

Oxysteroly mohou buněčnou proliferaci jak zvyšovat, tak inhibovat. Podobně je tomu u buněčné smrti – přítomnost oxysterolů může působit pro-apoptoticky i anti-apoptoticky, přičemž výsledný efekt záleží na konkrétním studovaném oxysterolu a jeho koncentraci i na sledovaném buněčném typu, na nějž daný oxysterol působí.

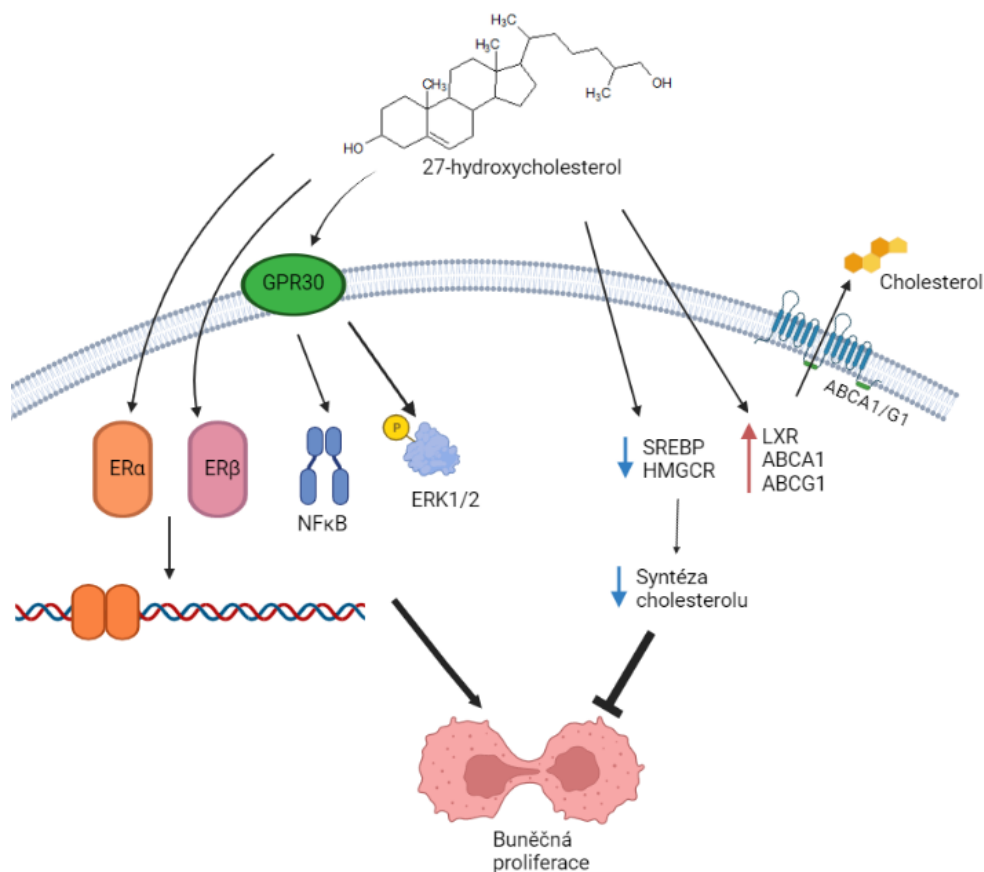
1.3.1.1 27-hydroxycholesterol

Příkladem oxysterolu, který zvyšuje buněčný růst a buněčnou proliferaci, je 27-HC. Působení tohoto oxysterolu je nejpodrobněji probádáno u karcinomu prsu. 27-HC je první prokázaný endogenní SERM (selektivní modulátor estrogenového receptoru, z angl. selective estrogen receptor modulator) (Umetani *et al.* 2007), který je schopný vázat se na molekulu estrogenového receptoru (ER) a aktivovat jej (Obrázek 3). Jeho přítomnost zvyšuje proliferaci ER pozitivních buněčných liniích karcinomu prsu MCF-7, HCC1428, T47D a ZR75-1, přičemž toto zvýšení je srovnatelné s působením estradiolu (Wu *et al.* 2013). Tento efekt byl kromě *in vitro* experimentů potvrzen také *in vivo* na CDX (z angl. cell line-derived xenografts) modelu

u myši s xenotransplantátem odvozeným z buněčné linie MCF-7. U myši po intraperitoneální aplikaci 27-HC došlo po 28 dnech k nárůstu hmotnosti nádoru o 73 % v porovnání s nádory u kontrolních jedinců (Wu *et al.* 2013). Mechanismus působení 27-HC na buněčnou proliferaci zahrnuje snížení transkripční aktivity a pokles hladiny tumor-supresorového proteinu p53, a také zvýšení hladiny proteinu MDM2, který se podílí na ubiquitinaci a degradaci proteinu p53 (Raza *et al.* 2015). Studie Ma *et al.* popisuje také zvýšení stability proteinu Myc prostřednictvím potlačení exprese jeho negativních regulátorů PP2A, SCP1 a FBW7, a tím zvýšení aktivity tohoto onkoproteinu (Ma *et al.* 2016). Na buněčné linii MCF-7 byl popsán tzv. bifázický efekt 27-HC – jeho nízká hladina (0,1 μ M) způsobovala rychlejší růst buněk v porovnání s kontrolními buňkami bez 27-HC, avšak vyšší koncentrace (\geq 5 μ M) způsobovaly zpomalení buněčného růstu (Wang *et al.* 2017a).

Význam 27-HC potvrzují také data získaná na vzorcích od pacientek, kdy hladina 27-HC byla nejnižší v prsní tkáni zdravých žen, vyšší hladina byla potom zjištěna v nemaligní tkáni pacientek s karcinomem prsu a nejvyšší hladina 27-HC byla stanovena v nádorové tkáni u pacientek (Wu *et al.* 2013). Aktivní roli 27-HC v progresi karcinomu prsu naznačuje řada dalších výsledků, mimo jiné expresní studie porovnávající pacientky s vysokou a nízkou hladinou enzymu CYP27A1, který má na svědomí syntézu 27-HC a CYP7B1, který 27-HC dále metabolizuje na 7 α ,27-dihydroxycholesterol ve směru syntézy žlučových kyselin. Pacientky s nižší expresí CYP7B1 transkriptu vykazují kratší celkové přežívání (Wu *et al.* 2013) a imunohistochemická analýza ukázala také vyšší hladinu proteinu CYP27A1 u méně diferencovaných nádorů, tj. vyššího stupně (tzv. tumor grade) (Nelson *et al.* 2013a).

27-HC zvyšuje buněčnou proliferaci také u dalších hormonálně závislých nádorů, jako je karcinom endometria. V tomto případě byla zjištěna zvýšená proliferace buněčné linie Ishikawa v přítomnosti 27-HC (Wu *et al.* 2013). K podobným výsledkům došla i další studie, kde 27-HC způsobil zvýšení proliferace buněčných linií Ishikawa a RL95. Jedná se o vysoce (Ishikawa) a středně (RL95) diferencované buněčné linie endometriálního karcinomu, které exprimují oba estrogenové receptory, tedy ER α i ER β . Naproti tomu, u buněčné linie endometriálního karcinomu MFE 280, která vychází z nízcce diferencovaného nádoru a má nízkou až nedetekovatelnou hladinu exprese ER α i ER β , nedochází v přítomnosti 27-HC ke změnám v proliferaci (Gibson *et al.* 2018).



Obrázek 3: Schématické znázornění účinku 27-hydroxycholesterolu v buněčných liniích. V přítomnosti 27-HC dochází k aktivaci estrogenového receptoru ER α a/nebo ER β , či proteinu GPR30 a v důsledku této aktivace dochází ke zvýšení buněčné proliferace. 27-HC ale také skrze regulaci proteinů SREBP, HMGCR, LXR, nebo některých ABC transportérů reguluje eflux cholesterolu z buněk a snižuje intracelulární syntézu cholesterolu. V důsledku tohoto mechanismu dochází naopak k potlačení buněčné proliferace. Vytvořeno pomocí programu BioRender (www.biorender.com).

Aktivace estrogenového receptoru ale nemůže být jediným mechanismem účinku 27-HC – jeho přítomnost způsobila vyšší proliferaci také u ER negativních buněčných linií karcinomu prsu a ovaria SKBR-3, MDA-MB-231 a MDA-MB-468 (Avena *et al.* 2022). V tomto případě se 27-HC váže na protein GPR30, receptor spážený s G-proteiny, který je v buňce aktivován estrogenem. V přítomnosti 27-HC dochází k jeho aktivaci také a v důsledku toho dochází k fosforylaci ERK1/2 a k aktivaci dráhy NF κ B (Avena *et al.* 2022). Dalším typem nádoru, kde byla zjištěna zvýšená proliferace v přítomnosti 27-HC, je glioblastom, konkrétně dvě buněčné linie - U251 a U118 MG. V těchto liniích byla také zjištěna aktivace signálních drah MAPK, mTOR, či Akt (Liu *et al.* 2019).

Vliv 27-HC na buněčnou proliferaci byl ale studován a prokázán také na jiných typech nádorů, kupříkladu u modelu myšního melanomu byla zjištěna zvýšená proliferace *in vitro* i *in vivo*. Myší buněčná linie B16-F10 vykazovala vyšší proliferaci *in vitro* v přítomnosti 27-HC,

příčemž tamoxifen tuto stimulaci inhiboval. Bylo zjištěno, že vyšší proliferace v přítomnosti 27-HC je způsobena aktivací ER α a dále také aktivací signálních drah MAPK a Akt (Tian *et al.* 2018). Význam 27-HC byl potvrzen také pomocí *in vivo* experimentů, kdy myši s inaktivovaným, tzv. knock-outovaným genem pro jaterní CYP27A1 vykazovaly pomalejší růst melanomu v porovnání s jedinci s funkčním genem (Lin *et al.* 2010). Zvýšení buněčné proliferace bylo pozorováno také u buněčných linií karcinomu plic H1395, H23, H1975 a A549 (Hiramitsu *et al.* 2018; Li *et al.* 2022; Takada *et al.* 2022). Toto zvýšení však nebylo zprostředkované ER α ani GPR30, nýbrž skrze protein ER β a, podobně jako v předchozím případě, také skrze aktivaci signální dráhy PI3K-Akt (Hiramitsu *et al.* 2018).

Zvýšení buněčné proliferace skrze ER β bylo dále pozorováno u buněk karcinomu prostaty LNCaP a PC3, ale také v nemaligním buněčném modelu prostaty RWPE-1 (Raza *et al.* 2017). Na druhou stranu, v další studii na karcinomu prostaty působil 27-HC anti-proliferálně, včetně inhibice fosforylace proteinů JAK2 a STAT3 a následnou inhibicí signální dráhy IL6-JAK-STAT *in vitro* (Dambal *et al.* 2020). Obdobné výsledky byly získány také v *in vivo* experimentech na myším CDX modelu vytvořeném pomocí lidské buněčné linie DU145, kdy denní subkutánní aplikace 27-HC způsobila zpomalení růstu nádorů (Dambal *et al.* 2020).

V buněčných liniích BV-2 (mikroglie) a PC12 (kryší feochromocytom) došlo v přítomnosti 27-HC k indukci senescence, v důsledku akumulace ROS. Tento efekt byl na rozdíl od prostatických linií doprovázen aktivací dráhy IL6-STAT3, což opět ukazuje na rozdílný mechanismus účinku 27-HC v různých buněčných typech (Liu *et al.* 2017). Nižší proliferaci buněk v přítomnosti 27-HC zjistila studie na dvou kolorektálních buněčných liniích Caco2 a SW620, kde pokles buněčné proliferace byl nezávislý na receptorech ER i LXR, ale byla zjištěna snížená aktivita signální dráhy Akt (Warns *et al.* 2018). Potlačení proliferace bylo rovněž prokázáno na buněčné linii HGC-27, která představuje *in vitro* model karcinomu žaludku. V tomto případě bylo prokázáno zpomalení proliferace v přítomnosti 27-HC a také dalšího oxysterolu, 24,25-EC (24,25-epoxycholesterol). V tomto případě se jednalo o mechanismus závislý na LXR β . Zajímavé však je, že snížení exprese (tzv. knock-down) genu pro LXR β pomocí siRNA způsobilo slabší potlačení buněčné proliferace v přítomnosti 27-HC, avšak zvýraznilo inhibici proliferace v přítomnosti 24,25-EC (Guo *et al.* 2018). Pokles proliferace v přítomnosti 27-HC byl dále zjištěn u buněčné linie Nthy-ori 3.1, která představuje model karcinomu štítné žlázy (Revilla *et al.* 2019).

Snížení buněčné proliferace a viability, snížení mitochondriálního membránového potenciálu a indukci apoptózy způsobuje 27-HC také v buňkách lidského neuroblastomu SH-SY5Y a v buněčné linii C6 - krysím buněčném modelu gliomu. Tento efekt byl doprovázen

snížením exprese proteinů SREBP1 a HMGCR a naopak zvýšením exprese mRNA a proteinu ABCA1 a LXR α (Wang *et al.* 2016). Stejný efekt byl pozorován také u buněčných linií karcinomu močového měchýře T24 a UM-UC-3, kde byla inhibice proliferace opět doprovázena zvýšením exprese transportérů ABCA1 a ABCG1 skrze regulaci LXR a sníženou hladinu mRNA pro LDLR (z angl. low-density lipoprotein receptor) (Liang *et al.* 2019) a dále u buněčných linií karcinomu ledvin 769-P (Zhang *et al.* 2022) a 786-O (Liang *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2022), kde opět došlo ke zvýšení exprese LXR a ABCA1 a poklesu exprese LDLR (Liang *et al.* 2022).

Z výše uvedeného je patrné, že 27-HC přispívá ke snížení buněčné proliferace ovlivněním homeostázy cholesterolu, kdy dochází k aktivaci dráhy LXR-ABCA1/ABCG1 a tím i zvýšení transportu cholesterolu ven z buňky. Současně zřejmě dochází ke snížení hladiny SREBP, který podporuje intracelulární syntézu cholesterolu regulací exprese enzymu HMGCR, klíčového v syntéze cholesterolu, a LDLR řízenému poklesu transportu extracelulárního cholesterolu (Liang *et al.* 2019). Inhibici proliferace v důsledku aktivace LXR a zvýšeného transportu cholesterolu z buněk zapříčinil 27-HC také v řadě buněčných linií karcinomu ovaria - ID8, MOE, HEY A8 a ES2, zatímco linie OVCAR3, CaOV3 a PEO4 exprimující ER byly vůči této inhibici rezistentní. U linie PEO4 s vysokou hladinou ER α došlo dokonce ke stimulaci proliferace (He *et al.* 2019). Zdá se tedy, že přítomnost a aktivace ER v buňkách dokáže převážit účinky aktivace LXR.

1.3.1.2 25-hydroxycholesterol

Dalším oxysterolem, který hraje významnou roli v nádorových buňkách, je 25-HC. Stejně jako 27-HC, je i 25-HC ligandem LXR (Janowski *et al.* 1996) a může tak potlačovat buněčnou proliferaci skrze aktivaci těchto receptorů. Na druhou stranu, 25-HC je podobně jako 27-HC schopný aktivovat receptor ER α a zvyšovat tak expresi ER α -cílových genů v buněčné linii karcinomu prsu MCF-7 a také v buněčné linii karcinomu ovaria BG-1. V obou těchto liniích dochází také k indukci buněčné proliferace v přítomnosti 25-HC (Lappano *et al.* 2011). Způsob aktivace ER se však u těchto dvou oxysterolů liší - zatímco 27-HC působí na molekulu ER jako SERM, 25-HC působí jako agonista (Lappano *et al.* 2011). Zvýšení proliferace buněčné linie MCF-7 bylo potvrzeno také v další studii, avšak toto zvýšení bylo mírnější než v případě 27-HC (Wu *et al.* 2013). S těmito výsledky je však v rozporu starší studie na buněčné linii MCF-7, která naopak zjistila snížení proliferace v přítomnosti 25-HC (Lin and Hwang 1991).

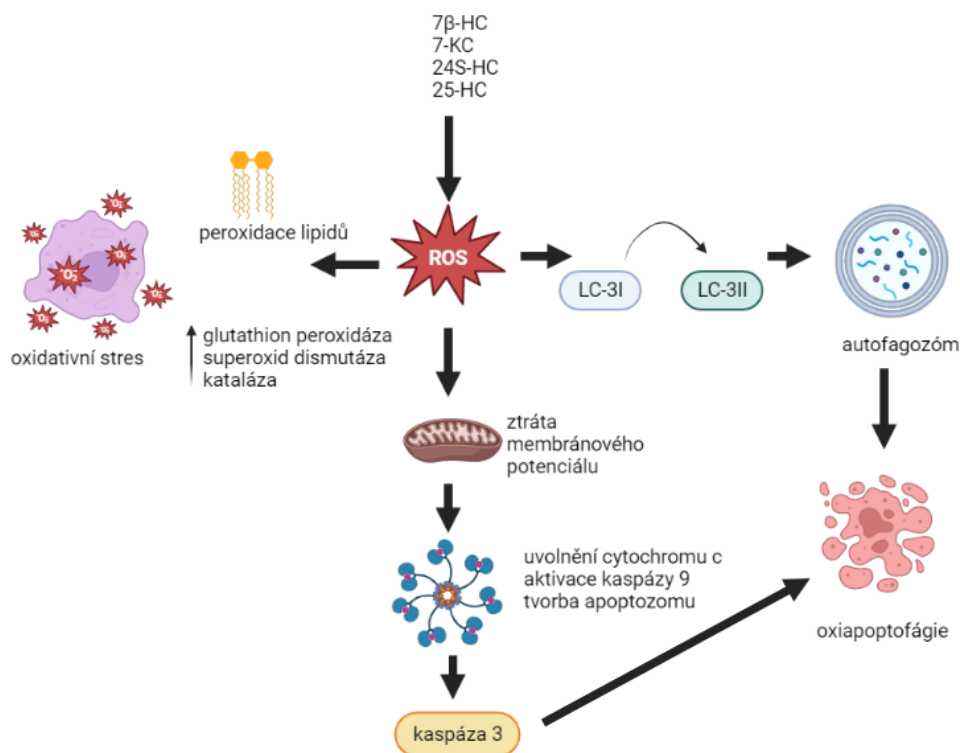
Také v případě karcinomu plic (Hiramitsu *et al.* 2018) a glioblastomu (Liu *et al.* 2019) byl efekt 25-HC stejný jako u 27-HC, došlo tedy ke zvýšení proliferace testovaných buněčných linií. Stejně jako v případě 27-HC, 25-HC snížil buněčnou viabilitu také v krysí linii C6, modelu gliomu (Maltese *et al.* 1981), i zde byl efekt spojen s poklesem aktivity HMGCR. Na rozdíl od této shody, studie na modelových liniích karcinomu močového měchýře T24 a RT4 zjistila, že 25-HC způsobuje zvýšení proliferace těchto buněk (Wang *et al.* 2020a).

Opačný efekt 25-HC, tedy zpomalení buněčné proliferace, byl pozorován na buněčné linii HMEC představující normální (nenádorový) prsní epitel a také na linii MDA-MB-231, tedy model ER negativního karcinomu prsu. Potlačení proliferace v tomto případě opět souviselo s blokováním aktivity HMGCR (Larsson and Blegen 1993). Stejný efekt na viabilitu a HMGCR byl pozorován také na buněčné linii HL60, modelu promyelocytické leukemie (Flach *et al.* 2000), indukce apoptózy 25-HC byla potom prokázána na leukemické buněčné linii CEM-C7 (Ayala-Torres *et al.* 1997), a to díky potlačení exprese proteinu c-myc na úrovni posttranskripční regulace (Ayala-Torres *et al.* 1999). Cytotoxicita 25-HC a akumulace buněk v G2/M fázi buněčného cyklu byla dále pozorována na buněčné linii THP-1, modelu lidské monocytické leukemie (Lim *et al.* 2003). Na myším modelu leukemie (linie K36) a lymfomu (linie EL4) bylo taktéž prokázáno snížení počtu živých buněk v přítomnosti 25-HC (Hwang 1992).

Snížení buněčné viability, zvýšení počtu apoptotických buněk, aktivace kaspáz 3, 7, 8 a 9, snížení exprese anti-apoptotických a naopak zvýšení exprese pro-apoptotických proteinů ze skupiny Bcl-2 bylo pozorováno také u buněčné linie FaDu, která je modelem nádorů hlavy a krku (You *et al.* 2020). 25-HC v tomto buněčném modelu spustil apoptózu jak vnější drahou indukovanou skrze Fas receptor, tak vnitřní mitochondriální drahou. Dalším efektem 25-HC bylo potlačení signálních drah jako je MAPK, PI3K/Akt, či NF κ B (You *et al.* 2020). Význam signalizace PI3K/Akt byl potvrzen také ve studii, jež se zabývala liniemi kolorektálního karcinomu. 25-HC spolu s lipoprotein-deficientním sérem zapříčinil výrazný počet apoptotických buněk u linií HT-29 a Colo-205, které mají mutaci v genu B-RAF, ale nesou nemutovaný (tzn. wild-type) onkogen Ras. U linií nesoucích mutaci v genu Ras (linie HCT-116 a LoVo) či obou zmíněných genech (linie BE) tato kombinace způsobila jen mírné zvýšení apoptotických buněk (Calleros *et al.* 2009). Apoptóza u Ras wild-type buněk byla provázána aktivací JNK kinázy, naopak buňky nesoucí Ras mutaci se vyhýbaly apoptóze skrze aktivaci dráhy PI3K/Akt, která narušila signalizaci skrze JNK. Ani u jedné buněčné linie přitom nedocházelo k aktivaci p38 MAP kinázy (Calleros *et al.* 2009). Další studie na buněčné linii kolorektálního karcinomu DLD-1 však naopak zjistila aktivaci p38 MAP kinázy v přítomnosti

25-HC a indukci anoikis, formy programované buněčné smrti (Tanaka *et al.* 2013). Dalším mechanismem, který může přispívat k apoptóze buněk v přítomnosti 25-HC, je působení proteinů z rodiny OSBP, kupříkladu na buněčných liniích hepatomu HepG2 a Huh7 bylo prokázáno, že cytotoxický efekt 25-HC zprostředkovává protein ORP8 (Li *et al.* 2016).

Pokles buněčné proliferace a viability byl dále pozorován u nenádorových buněčných linií, jako jsou buňky hladké svaloviny cév (Awad *et al.* 2001). Vyšší hladina ROS provázená apoptózou buněk, konkrétně oxiaoptofágií byla pozorována u myších fibroblastů L929 (You *et al.* 2022). Tento typ buněčné smrti, jak už název napovídá, zahrnuje oxidativní stres spojený s typickými znaky apoptózy a autofágie (Obrázek 4). V buňkách dochází k nadprodukcí ROS, zvýšení hladiny enzymů s antioxidační aktivitou (glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza, kataláza), nebo peroxidaci lipidů, dále k aktivaci apoptózy skrze vnitřní (mitochondriální) dráhu, ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu, aktivaci kaspázy 3, degradaci PARP (poly (ADP-ribóza) polymeráza), snížené expresi Bcl-2 a kondenzaci a/nebo fragmentaci jádra, projevy autofágie potom zahrnují tvorbu velkých cytoplasmatických vakuol, které představují autofagické vakuoly a také aktivaci cytozolického proteinu LC-3I na LC-3II, která je považovaná za marker autofágie (Klionsky *et al.* 2008). Oxysteroly indukovanou oxiaoptofágií podrobněji popisuje přehledový článek Nury *et al.* (Nury *et al.* 2021).



Obrázek 4: Schéma účinku některých oxysterolů a jejich indukce oxiaoptofágie. Pro některé oxysteroly, jako je 7β-HC, 7-KC, 24(S)-HC, či 25-HC byl popsán specifický způsob buněčné smrti, tzv. oxiaoptofágie, která zahrnuje typické markery apoptózy i autofágie. Vytvořeno pomocí programu BioRender (www.biorender.com).

Na druhou stranu, na modelu buněk pigmentového epitelu sítnice ARPE-19 25-HC sice významně zvyšoval produkci ROS a také prozánětlivých chemokinů (IL-8, MCP-1), ale nedocházelo ke snížení buněčné viability (Dugas *et al.* 2010). Na modelu buněčné linie oligodendrocytů 158N byla zjištěna snížená viabilita, nárůst počtu apoptotických buněk, depolarizace mitochondriální membrány a narušení integrity lysozomů (Nury *et al.* 2013; Trousson *et al.* 2009), s tímto efektem opět souvisela aktivace LXR β a také dalšího receptoru, PXR (z angl. pregnane X receptor), které dále zapříčinili aktivaci fosfolipázy A2 (Trousson *et al.* 2009). Snížení viability bylo pozorováno také na primárních progenitorových buněk oligodendrocytů, kde v přítomnosti 25-HC docházelo k potlačení fosforylace proteinu Akt, tedy potlačení signalizace IGF-I-PI3K/Akt (Romanelli *et al.* 2009).

Z dostupných zdrojů je tedy patrné, že výsledný účinek 25-HC opět velmi záleží na konkrétním buněčném typu, který je studován. Některé mechanismy účinku, jako je ovlivnění buněčné proliferace skrze ER, LXR, či HMGCR, jsou podobné jako u 27-HC. Ne ve všech buněčných typech jsou však účinky obou oxysterolů shodné a bude nutné provést další analýzy pro konečné objasnění jejich účinku.

1.3.1.3 7-ketocholesterol

7-KC je dalším biologicky aktivním oxysterolem. Jeho vznik je zapříčiněn zejména působením ROS a jeho přítomnost dále přispívá ke zvyšování oxidativního stresu v buňkách, následkem čehož může docházet k oxiaoptofágii, jak bylo popsáno na buněčné linii 158N (Nury *et al.* 2015; Nury *et al.* 2014). Podobné výsledky byly publikovány také pro buněčnou linii MC3T3-E1, model myších osteoblastů. Zde v přítomnosti 7-KC docházelo k poklesu buněčné viability, zvýšení ROS, aktivaci kaspáz 3 a 7 a také ke zvýšení exprese dvou markerů stresu endoplasmatického retikula, CHOP a GPR78. Tyto účinky 7-KC byly potlačeny u buněk, které byly předem inkubovány s N-acetylcysteinem, inhibitorem ROS (Sato *et al.* 2017). Na modelu myších makrofágů RAW264.7 byl opět pozorován podobný efekt, tedy tvorba ROS, poškození mitochondrií, uvolnění cytochromu c a aktivace kaspáz 9 a 3 (Xiao *et al.* 2020). Mutagenní efekt 7-KC, dvojřetězcové zlomy v DNA, zvýšená aktivace superoxid dismutázy (SOD) a kaspáz 3 a 7 byly rovněž pozorovány na buněčné linii CHO získané z ovarii čínského křečka (Wang *et al.* 2020b), genotoxický efekt byl v tomto případě snížen při využití butyl hydroxytoluenu (BHT), který inhiboval peroxidaci lipidů.

Na modelové linii ARPE-19 byla však v přítomnosti 7-KC zjištěna buněčná smrt na kaspázách nezávislá, doprovázená opět zvýšenou produkcí ROS a prozánětlivého interleukinu

IL-8 (Dugas *et al.* 2010). Cytotoxický efekt, hyperpolarizace mitochondriálních membrán a zvýšení apoptózy buněk bez signifikantních změn v aktivaci kaspáz 3 a 7 byl pozorován v lidských mezenchymálních kmenových buňkách izolovaných z tukové tkáně (Levy *et al.* 2014).

Kromě popsáných efektů na buňky nenádorového charakteru, může být 7-KC ale také zajímavým hráčem ve studiu nádorů. 7-KC je hlavním produktem oxidace LDL (Brown *et al.* 1996), přičemž přítomnost tzv. oxLDL v séru pozitivně koreluje se zvýšeným rizikem karcinomu prsu, nebo ovaria (Delimaris *et al.* 2007). Vliv oxLDL byl studován na řadě nádorových buněčných liniích - HT29 (karcinom tlustého střeva), OVCAR3, OVCAR5 (karcinom ovaria), HeLa (karcinom děložního čípku), MCF-7 (karcinom prsu), A549 (karcinom plic) a PC3 (karcinom prostaty), přičemž u všech linií došlo ke zpomalení proliferace buněk a snížení buněčné viability v přítomnosti těchto oxidovaných lipoproteinů, zatímco neoxidované LDL neměly na viabilitu žádný vliv (Zabirnyk *et al.* 2010). Tento efekt byl doprovázen zvýšenou produkcí ROS, štěpením PARP (poly(ADP-ribozo)polymerázy) a aktivací LC-3I na LC-3II, můžeme tedy opět mluvit o oxiaoptofagii. Při podrobnější analýze bylo zjištěno, že hlavní komponentou oxLDL, která způsobuje tento efekt na buněčné kultury, je právě 7-KC (Zabirnyk *et al.* 2010). Cytotoxický efekt 7-KC byl rovněž pozorován u ER negativní buněčné linie MDA-MB-231, kde v jeho přítomnosti došlo k poklesu počtu živých buněk. Tento efekt byl provázen zvýšenou expresí proteinu SMO a dále zvýšenou expresí receptoru LXR α a transportérů ABCA1 a ABCG1 (Levy *et al.* 2019).

Na druhou stranu, existují také práce, které popisují mitogenní efekt 7-KC při použití nízkých koncentrací. Na buňkách hladké svaloviny získaných z aorty 8 krysích jedinců byla prokázána zvýšená proliferace buněk inkubovaných s 2,5 μ M 7-KC v porovnání s kontrolními buňkami, přičemž do tohoto zvýšení proliferace byly zahrnuty signalizace EGFR, ERK a PI3K/Akt (Liao *et al.* 2010). Podobně jako u 27-HC, byl i pro 7-KC popsán tzv. bifázický efekt. Přítomnost 7-KC v nízkých koncentracích zvyšovala buněčnou proliferaci a naopak ve vyšších koncentracích docházelo k potlačení buněčného růstu v přítomnosti 7-KC. Tento efekt byl pozorován u ER pozitivních linií MCF-7, T47D a MCF-7/ADR (linie MCF-7 resistantní k doxorubicinu), ale ne u ER negativní buněčné linie MDA-MB-231 (Wang *et al.* 2017a), avšak starší studie na linii MCF-7 tento efekt u 7-KC nepozorovala (Wu *et al.* 2013). Studie Wang *et al.* navíc prokázala prostřednictvím kvasinkového reportérového systému (YES, z angl. yeast reporter systém), že přítomnost 7-KC slabě (o 14 %) stimulovala aktivitu receptoru ER α (Wang *et al.* 2017a). Studie na modelové linii APRE-19 však naopak prokázala inhibici signalizace prostřednictvím ER v přítomnosti 7-KC (Dasari *et al.* 2013).

Zdá se tedy, že 7-KC může aktivovat či inhibovat ER v závislosti na buněčném typu a pokud se 7-KC v dalších studiích potvrdí jako agonista ER v buněčných liniích karcinomu prsu, mohl by tento efekt přispívat k popsanému bifázickému efektu 7-KC.

1.3.1.4 7 β -hydroxycholesterol

Efekt 7 β -HC je zejména cytotoxický. Stejně jako v případě 7-KC, byla u buněk 158N v přítomnosti 7 β -HC popsána oxiaoptofágie (Nury *et al.* 2015) a, také stejně jako u 7-KC, byla na buněčné linii ARPE-19 v přítomnosti 7 β -HC pozorována aktivace na kaspázách nezávislé apoptózy. V tomto případě opět docházelo k nadprodukci ROS a IL-8 (Dugas *et al.* 2010). Snížení buněčné viability bylo pozorováno také v buněčné linii karcinomu kolorekta Caco2. Přítomnosti 7 β -HC nezpůsobila aktivaci kaspázy 3 ani 8, aktivita kaspázy 9 byla signifikantně zvýšená až s výrazným zpožděním. Přítomnost inhibitoru kaspáz Z-VAD.fmk navíc neměla na účinek 7 β -HC žádný vliv (Roussi *et al.* 2005), zdá se tedy, že i zde je indukce apoptózy zprostředkována na kaspázách nezávislým mechanismem. Exprese proteinů Bcl-2 a Bax byla v přítomnosti 7 β -HC také nebyla nezměněna, avšak došlo ke zvýšení oxidativního stresu, poklesu mitochondriálního membránového potenciálu a uvolnění cytochromu c, při 7 β -HC indukované apoptóze tedy dochází k permeabilizaci mitochondriální membrány (Roussi *et al.* 2007). Efekt 7 β -HC v buněčné linii Caco2 byl dále provázen akumulací buněk v S fázi buněčného cyklu (Roussi *et al.* 2005), zatímco v buněčné linii THP-1 byla apoptóza buněk provázená akumulací buněk v G2/M fázi (Lim *et al.* 2003), stejně jako bylo v předchozí kapitole popsáno pro 25-HC.

Snížená viabilita byla pozorována také u monocytické buněčné linie U937 izolované z histiocytického lymfomu (Lordan *et al.* 2008; Lyons *et al.* 2001), přičemž tento efekt 7 β -HC byl snížen v případě inkubace buněk současně s 7 β -HC a α -tokoferolem (Lyons *et al.* 2001), který patří mezi antioxidanty. Jiné antioxidanty, jako apigenin, lykopen, či astaxantin, však neměly stejný efekt (Lordan *et al.* 2008). Stejně jako u linie Caco2, byl i u buněk U937 efekt doprovázen sníženým membránovým potenciálem a uvolněním cytochromu c, ale ne aktivací kaspázy 8 (Ryan *et al.* 2005).

Přítomnost 7 β -HC způsobila pokles viability také ve čtyřech liniích představujících modely pro studium nádorů hlavy a krku, SCC9, SCC25, CAL27 a FaDu. U těchto buněk byla pozorována jak apoptóza, tak nekróza a to v různém poměru v závislosti na buněčné linii a koncentraci 7 β -HC. Efekt byl u buněk dále doprovázen sníženou expresí cyklooxygenázy-2, zatímco exprese cyklooxygenázy-1 nebyla změněna (Heiduschka *et al.* 2009). Buněčná smrt modelové linie glioblastomu C6 v přítomnosti 7 β -HC byla doprovázená změnami na úrovni

membránových lipidů – docházelo ke změnám v poměru volného a esterifikovaného cholesterolu – v kontrolních buňkách volný cholesterol představoval až 75 % všech sterolů, zatímco přítomnosti 7 β -HC pouhá 2 %. V membránách docházelo k akumulaci 7-ketohydroxycholesterolu, 7 β -HC a jeho esterů. Současně docházelo k fosforylaci AMP-aktivované protein kinázy, aktivaci signalizace PI3K/Akt, aktivaci p38 MAPK. V prvních 6 hodinách inkubace došlo rovněž k aktivaci kinázy ERK, ale ta byla po 24 hodinách inkubace s 7 β -HC naopak zcela inhibována. K fosforylaci Akt a p38 MAPK však nedošlo, pokud byl současně přidán inhibitor esterifikace 7 β -HC - tetrakain (Clarion *et al.* 2012). Z výše uvedeného je patrné, že právě esterifikace je pro účinnost 7 β -HC klíčová.

1.3.1.5 Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol

Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol, nazývaný zjednodušeně také jako cholestantriol, triol nebo CT, patří mezi vysoce toxické oxysteroly. Na buněčné linii křeččích ovarí CHO prokázal nejvyšší schopnost inhibovat buněčnou viabilitu mezi sedmi testovanými oxysteroly (CT, 25-HC, 19-hydroxycholesterol, 7-KC, 7 β -HC, α -EC, β -EC), kdy hodnota IC₅₀ po 24hodinové inkubaci byla pro CT 43 \pm 20 μ M, pro 25-HC 60 \pm 18 μ M a v případě všech dalších oxysterolů přesahovala 100 μ M (Woods and O'Brien 1998). Na buněčné linii CHO-K1, která je subklonem linie CHO, byl pozorován genotoxický účinek CT (ale ne 7-KC ani α -EC. Přítomnost CT zvýšila tvorbu ROS, zvýšila výskyt chromozomových aberací a pomocí Amesova testu byla prokázána jako mutagenní (Cheng *et al.* 2005). Tento efekt CT byl potlačen, pokud byly buňky předem inkubovány s katalázou či superoxid dismutázou.

CT významně snížil buněčnou proliferaci u třech testovaných linií karcinomu prostaty LNCaP, CDXR-3, DU-145 a PC-3 *in vitro* (Lin *et al.* 2013), ale také v *in vivo* experimentech, kdy denní dávka 20 mg/kg CT po dobu 3 týdnů významně zpomalila růst nádorů. Na modelových liniích byla pozorována akumulace buněk v G1 fázi buněčného cyklu. Na *in vitro* i *in vivo* úrovni byla pozorována inhibice Akt signalizace a CT se projevil také jako slabý aktivátor LXR α (Lin *et al.* 2013). Stejně tak na buněčné linii MDA-MB-231 byla spolu s indukcí buněčné smrti v přítomnosti CT pozorována zvýšená exprese LXR α a dále také exprese ABCA1, ABCG1 a proteinu SMO (Levy *et al.* 2019).

V porovnání s výše zmíněnými oxysteroly patří CT u nádorových linií zatím k těm méně prostudovaným a jeho účinky na různé buněčné kultury, včetně specifických molekulárních mechanismů bude potřeba prostudovat v dalších analýzách.

1.3.1.6 5 α ,6 α -epoxycholestanol a 5 β ,6 β -epoxycholestanol

α -EC a β -EC patří mezi produkty autooxidace cholesterolu a prekurzory CT. Hydrolýzu α/β -EC na CT katalyzuje komplex AEBS (z angl. antiestrogen binding sites), který se skládá ze dvou enzymů - 3 β -hydroxysterol- Δ 8- Δ 7-isomerázy (D8D7I, či také EBP – z angl. emopamil binding protein) a 7-dehydrocholesterol reduktázy (DHCR7). Mezi ligandy tohoto komplexu patří nejen α/β -EC a CT, ale také například tamoxifen (de Medina *et al.* 2010). Vazba tamoxifenu na AEBS způsobuje akumulaci α/β -EC v buněčné linii MCF-7 a tato akumulace v buňce přispívá k buněčné smrti. V případě α -EC mechanismem závislým na LXR β a v případě β -EC mechanismem na LXR nezávislým (Segala *et al.* 2013). Akumulace těchto oxysterolů je tedy jedním z dalších mechanismů účinku tamoxifenu.

Jak bylo popsáno dalšími studiemi výše, na rozdíl od CT nebyla přítomnost α -EC a/nebo β -EC popsána jako cytotoxická nebo genotoxická (Cheng *et al.* 2005; Woods and O'Brien 1998).

1.3.1.7 Ostatní oxysteroly

Mezi ostatními oxysteroly můžeme zmínit například 7 α -HC, který je spolu s 25-HC, 7 β -HC a 7-KC součástí oxLDL partikulí. Ze všech 4 zmíněných oxysterolů je však nejméně toxický (Rodriguez *et al.* 2004) pro buněčné linie pigmentového epitelu sítnice. Podobně tomu bylo u buněčné linie U937, kde 7 β -HC a 7-KC, ale ne 7 α -HC, způsobovaly apoptózu buněk, doprovázenou fragmentací buněčného jádra, ztrátou mitochondriálního potenciálu, aktivací kaspázy 3, degradací PARP, nebo zvýšenou produkcí ROS (Miguet-Alfonsi *et al.* 2002).

Účinky 4 α -hydroxycholesterolu (4 α -HC) a 4 β -HC byly studovány v buněčné linii 158N. V případě 4 α -HC byly pozorovány pouze mírné účinky na buněčnou viabilitu při použití vysokých koncentrací tohoto oxysterolu. Na rozdíl od 4 α -HC, přítomnost 4 β -HC způsobila ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu, poruchy integrity lysosomální membrány a zvýšenou tvorbu ROS. 4 β -HC potlačoval buněčný růst, toto potlačení bylo však méně účinné v porovnání s 7-KC a 25-HC. 4 β -HC, avšak nikoliv 4 α -HC, také aktivoval LXR α i LXR β (Nury *et al.* 2013).

24-HC je oxysterolem studovaným zejména v souvislosti s neurodegenerativními poruchami. Z nádorových onemocnění byl popsán jeho vliv na vývoj neuroendokrinního nádoru pankreatu (Soncini *et al.* 2016). Studie na buněčné linii karcinomu močového měchýře T24 popsala mírné zvýšení buněčné proliferace v přítomnosti 24(S)-HC (Wang *et al.* 2020a). Na buněčné linii 158N pro něj, stejně jako pro dříve zmíněné oxysteroly, byla popsána indukce

oxiapoptofágie (Nury *et al.* 2015). Ta byla popsána také v případě 7 α ,25-dihydrocholesterolu u buněčné linie myších fibroblastů L929 (Kim *et al.* 2022).

V neposlední řadě je pak třeba dodat, že oxysteroly se v lidském těle nevyskytují jednotlivě, ale v komplexní směsi a je proto zajímavé podívat se také na jejich působení dohromady. Studie Biasi *et al.*, zkoumala mix oxysterolů v poměru, v jakém jsou zastoupeny v potravinách bohatých na cholesterol, kde vznikají právě v důsledku oxidace cholesterolu. Pro test účinku tohoto mixu byla využita buněčná linie Caco2 a mix o koncentraci 60 μ M, kde zastoupení jednotlivých oxysterolů bylo 42,96 % 7-KC, 32,30 % α -EC, 5,76 % β -EC, 4,26 % 7 α -HC a 14,71 % 7 β -HC. Následně na této buněčné linii testovali také účinky jednotlivých oxysterolů a to v koncentracích, v jakých byly zastoupeny v mixu: 25,8 μ M 7-KC, 19,4 μ M α -EC, 3,4 μ M β -EC, 2,6 μ M 7 α -HC a 8,8 μ M 7 β -HC. Buňky inkubované s mixem oxysterolů vykazovaly zvýšenou aktivitu kaspáz 3 a 7, mírné zvýšení aktivity NADPH oxidázy NOX1, produkci IL-8 a MCP-1. V případě aplikace jednotlivých oxysterolů se jako nejúčinnější prokázal 7 β -HC, v jehož přítomnosti byla aktivace kaspáz signifikantně vyšší nejen v porovnání s kontrolními buňkami, ale také v porovnání s buňkami inkubovanými s mixem oxysterolů. Aktivace NOX1 byla taktéž vyšší v případě inkubace s jednotlivými oxysteroly, konkrétně α -EC a 7 β -HC, v porovnání s mixem oxysterolů. Změna na úrovni IL-8 nebyla v případě inkubace s jednotlivými oxysteroly signifikantní u žádného ze studovaných oxysterolů, ale změna na úrovni MCP-1 proteinu byla opět signifikantní u 7 β -HC testovaného samostatně (Biasi *et al.* 2013). Při analýzách oxysterolů je tedy potřeba myslet i na tento fenomén, kdy oxysterol použitý samostatně může vykazovat jinou účinnost, než při jeho použití ve stejné koncentraci, ale v kombinaci s dalšími testovanými oxysteroly.

1.3.2 Buněčná migrace a invazivita

Dalším procesem, který může být v přítomnosti oxysterolů ovlivněn, je buněčná migrace a invazivita. Tento proces je důležitý v řadě procesů, jako je hojení ran, embryogeneze, či imunitní odpověď, v případě nádorových buněk je potom klíčový pro tvorbu metastáz.

Prvním oxysterolem, který bude v této kapitole diskutován, je 27-HC. Kromě již dříve publikovaného vlivu na proliferaci buněčných linií karcinomu prsu, byl na těchto modelech popsán také vliv na buněčnou migraci a invazivitu. U ER pozitivní buněčné linie karcinomu prsu MCF-7 byly pozorovány změny vedoucí k mezenchymálnímu fenotypu buněk, pokles E-kadherinu a β -kateninu (Torres *et al.* 2011). U ER pozitivních linií MCF-7 a T47D, ale také u ER negativních buněk MDA-MB-231 došlo v přítomnosti 27-HC ke zvýšené tvorbě ROS, aktivaci STAT3 a VEGF signalizace a v důsledku toho také k indukci exprese matrix

metaloproteinázy 9 (MMP9) (Shen *et al.* 2017; Zhu *et al.* 2016). Buňky vykazovaly zvýšenou expresi vimentinu a proteinu ZEB1 a pokles exprese E-kadherinu (Shen *et al.* 2017). Všechny tyto změny nasvědčují tzv. epiteliálně-mezenchymální tranzici (EMT), ke které u nádorových buněk dochází při procesu vzniku metastáz. Také další práce popisuje indukci migrace a invazivity buněk a indukci exprese markerů EMT u buněk karcinomu prsu nezávisle na ER α . V tomto případě autoři popisují aktivaci IGF a EGF signalizace skrze ER β (Mashat *et al.* 2021). Přítomnost 27-HC může dále indukovat také endoteliální-mezenchymální tranzici (EndMT) u endoteliálních buněčných linií HMEC-1 a HUVEC. V těchto buněčných liniích došlo inkubací s 27-HC ke zvýšení exprese MMP2 a MMP9 a také k aktivaci STAT3. Společnou kokultivací bylo navíc zjištěno, že indukce EndMT u endoteliálních buněk usnadňuje EMT u epiteliálních buněčných linií karcinomu prsu (Jiao *et al.* 2020). 27-HC má tedy na nádorové buňky nejen přímý vliv, ale může je ovlivňovat i nepřímo skrze buňky nádorového mikroprostředí a napomáhat indukci angiogeneze nezávisle na ER statusu buněk karcinomu prsu.

Velmi podobný výsledek byl pozorován také u karcinomu plic, konkrétně u buněčných linií A549 a H1975, kdy přítomnost 27-HC zvyšovala invazivitu testovaných buněčných linií a to jak samostatně, tak ale zejména v experimentu, kdy byly buňky karcinomu plic kokultivovány s makrofágy odvozenými od buněčné linie THP-1 (Li *et al.* 2022). EMT, zvýšená migrace a invazivita v přítomnosti byly rovněž pozorovány u buněčných linií glioblastomu (Liu *et al.* 2019). 27-HC také zvyšuje migraci v buněčných liniích hepatocelulárního karcinomu Huh7 a HCC-MC3 bez ovlivnění buněčné proliferace (He *et al.* 2022). U buněčných linií karcinomu štítné žlázy potom dochází ke zvýšení migrace buněk, ačkoli proliferace těchto buněk je při inkubaci (se stejnými koncentracemi) 27-HC snižena v porovnání s kontrolními buňkami (Revilla *et al.* 2019). 27-HC má v neposlední řadě také imunostimulační účinky - indukuje migraci monocytů a lymfocytů, aktivuje signalizaci PI3K/Akt a zvyšuje expresi chemokinů CCL2, CCL3 a CCL4, či expresi MMP9, čímž přispívá k vyvolání zánětlivé reakce (Kim *et al.* 2016; Kim *et al.* 2014; Shi *et al.* 2019).

U modelových buněčných linií prostaty bylo naopak zjištěno zpomalení invazivity v přítomnosti 27-HC, avšak jen u nádorových linií LNCaP a PC3, ale ne u nemaligní linie epitelu prostaty RWPE-1 (Raza *et al.* 2017). Jak je již popsáno v předchozí kapitole, proliferace byla přítom zvýšená v případě všech tří testovaných linií. Naopak zpomalení proliferace i migrace/invazivity bylo pozorováno na buněčné linii karcinomu prostaty DU145 (Dambal *et al.* 2020), a dále také na modelových liniích renálního karcinomu 786-O a 769-P (Liang *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2022) a karcinomu žaludku HGC-27 (Guo *et al.* 2018).

Zvýšení migrace a invazivity buněk karcinomu žaludku AGS a MGC-803 zjistili autoři studie Wang *et al.* při inkubaci těchto buněk s 25-HC. Spolu se zvýšenou migrací a invazivitou autoři detekovali zvýšenou aktivitu MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 a MMP13, a dále aktivaci receptoru TLR2 (z angl. Toll-like receptor 2) a NFκB. 25-HC přitom neovlivňoval proliferaci studovaných linií (Wang *et al.* 2019b). Ke stejnému výsledku došli autoři také u buněčné linie hepatocelulárního karcinomu HepG2, kdy v přítomnosti 25-HC opět došlo ke zvýšené aktivaci jmenovaných matrix metaloproteináz. V tomto případě byla však migrace a invazivita závislá na receptoru TLR4. Ve jmenovaných buňkách opět došlo k aktivaci NFκB a dále také k aktivaci celé řady proteinů signálních kaskád - ERK, p38 MAPK, SAPK/JNK, PI3K/AKT a STAT-3 (Wang *et al.* 2019a). 25-HC zvyšoval také proliferaci a invazivitu u modelových linií plicního adenokarcinomu A549 a NCL-H1975 a to jak samostatně, tak v případě kokultivace s THP-1 derivovanými makrofágy. Zvýšení migrace bylo závislé na aktivaci LXR a sekreci IL-1β, které dále způsobovaly zvýšení exprese proteinu Snail (Chen *et al.* 2017).

Glioblastomové buněčné linie U87MG and GM133 navíc v přítomnosti prozánětlivých cytokinů (TNFα, IL-1β) zvyšují expresi cholesterol 25-hydroxylázy, enzymu který syntetizuje 25-HC. Zvýšená syntéza a sekrece 25-HC pak má za následek indukci migrace THP-1 monocytů, které byly v citované studii použity jako model makrofágů asociovaných s nádorem (z angl. tumor-associated macrophages) (Eibinger *et al.* 2013). Tyto výsledky naznačují, že by syntéza 25-HC mohla přispívat k přilákání imunitních buněk do nádorového mikroprostředí a ukazují možnou cestu k využití tohoto fenoménu v cílené terapii.

V přítomnosti 25-HC a 7-KC bylo naopak zaznamenáno zpomalení migrace buněk SRA 01/04 lidského epiteliálního modelu čočky. Tento efekt oxysterolů zahrnoval aktivaci malých GTPáz, jako jsou Rho, Rac a Cdc42, které regulují aktinový cytoskelet (Girao *et al.* 2003). Zpomalení migrace buněk v přítomnosti 7-KC bylo dále pozorováno na endotelových buňkách HUVEC získaných z lidské pupečnickové žíly (Honda *et al.* 2018) a buňkách získaných z cévní hladké svaloviny (Oyama *et al.* 2002). Na druhou stranu, na buňkách hladkého svalstva aorty získaných z krysy byla v přítomnosti 7-KC a α-EC pozorována stimulace migrace společně s vyšší expresí MMP2 a MMP9, a aktivací PI3K/AKT a EGFR (Liao *et al.* 2010). 7-KC dále indukoval EndMT a migraci skrze aktivaci TGFβ a SMAD3 u choroidálních endoteliálních buněk (Wang *et al.* 2021). Zvýšená migrace v přítomnosti 7-KC byla pozorována i v případě mikroglií (Diestel *et al.* 2003; Indaram *et al.* 2015) a makrofágů (Uchikawa *et al.* 2022). Všechny analýzy vlivu 7-KC na buněčnou migraci tak ukazují na jeho úlohu v prozánětlivých procesech a onemocněních jako je ateroskleróza či makulární degenerace, avšak do doby

dokončení této dizertační práce nebyla publikována žádná studie analyzující potenciální vliv 7-KC na buněčnou migraci u nádorových modelů.

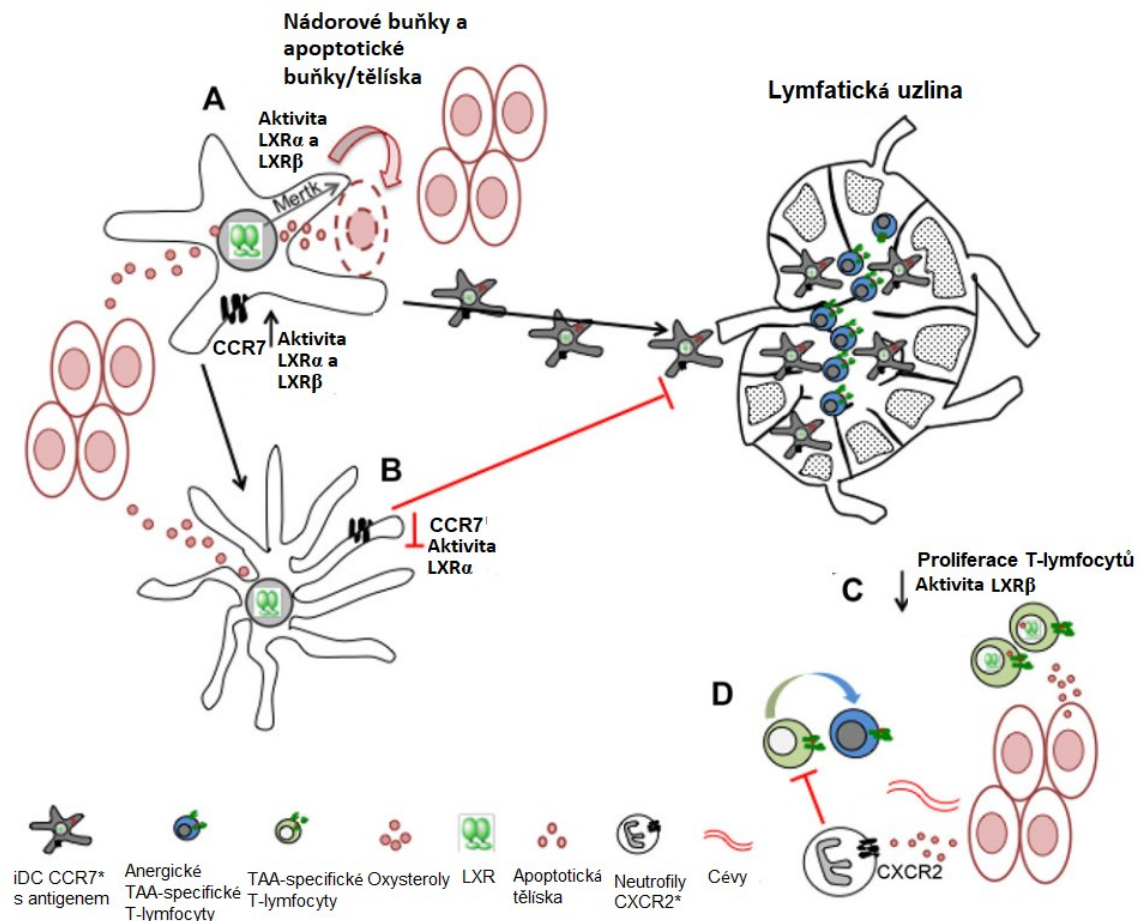
Z dalších oxysterolů můžeme zmínit CT, který významně zpomalil buněčnou migraci i invazivitu u linií karcinomu prostaty LNCaP, CDXR-3, DU-145 a PC-3 (Lin *et al.* 2013), nebo 7 α -HC, který naopak zvýšil migrační potenciál buněčné linie THP-1 (Kim *et al.* 2015).

1.3.3 Oxysteroly a imunitní systém

Tématu, jak přítomnost oxysterolů ovlivňuje buňky imunitního systému a jeho fungování za různých fyziologických i patologických podmínek, se věnuje řada experimentálních studií i přehledových publikací. Vliv oxysterolů na imunitní systém je často studován u neurodegenerativních a střevních onemocnění, revmatoidní artritidy, nádorů, aterosklerózy, či respiračních onemocnění (de Freitas *et al.* 2022). Vzhledem k významu imunitního systému v procesu karcinogeneze je potřeba toto téma krátce zmínit i v této dizertační práci, i když experimentálně nebylo zahrnuto.

Vliv oxysterolů na fungování imunitního systému můžeme rozdělit na 1) zprostředkovaný LXR a 2) LXR nezávislý (Traversari *et al.* 2014). Přítomnost oxysterolů ovlivňuje různé typy imunitních buněk, jako jsou makrofágy, neutrofilní granulocyty, dendritické buňky, oligodendrocyty, astrocyty, či lymfocyty T a B řady (de Freitas *et al.* 2022; Traversari *et al.* 2014). Obecně jejich efekt vede k potlačení protinádorové imunitní odpovědi (Obrázek 5).

Jedním z příkladů je schopnost oxysterolů inhibovat expresi chemokinového receptoru CCR7 skrze LXR α v dozrávajících dendritických buňkách, potlačovat jejich migraci do mizních uzlin a aktivovat T-lymfocyty (Villablanca *et al.* 2010). Tento účinek je však zcela opačný v nezralých dendritických buňkách (Feig *et al.* 2010). Kromě toho mohou oxysteroly, opět skrze aktivaci LXR, potlačovat proliferaci aktivovaných B- a T-lymfocytů (Bensinger *et al.* 2008). Oxysteroly také působí jako chemoatraktans pro neutrofilní granulocyty a napomáhají tak jejich infiltraci do nádorového mikroprostředí (Raccosta *et al.* 2013b). Tento jev je zprostředkovaný mechanismem nezávislým na LXR, skrze chemokinový receptor CXCR2 (Raccosta *et al.* 2013a).



Obrázek 5: Schéma účinku oxysterolů na buňky imunitního systému v nádorovém prostředí. (A) V případě nezralých dendritických buněk v nádorovém mikroprostředí dochází k aktivaci LXR a k expresi *MERTK*, zvýšené fagocytóze nádorových antigenů, a migraci dendritických buněk do mizních uzlin. (B) V případě zralých dendritických buněk je ale efekt opačný, dochází k inhibici chemokinového receptoru CCR7, potlačení migrace dendritických buněk do mizních uzlin a tudíž i potlačení aktivace T-lymfocytů. (C) Oxysteroly uvolněné z nádorových buněk mohou také zpomalit proliferaci tumor-infiltrujících T-lymfocytů či působit (D) mechanismem závislým na chemokinovém receptoru CXCR2 a lákat do nádorového mikroprostředí neutrofilní granulocyty, které potlačují aktivitu T-lymfocytů a/nebo indukují neoangiogenezi. iDC – nezralé dendritické buňky, TAA – s tumorem asociované antigeny. Převzato a upraveno podle Traversari *et al.* (Traversari *et al.* 2014).

1.3.4. Oxysteroly a protinádorová terapie

Kromě všech výše zmíněných vlivů, které oxysteroly mají na řadu buněčných typů a jakými mohou přispívat ke karcinogenezi, nádorové progresi i tvorbě metastáz, může přítomnost oxysterolů ovlivňovat také účinnost protinádorové terapie. V posledních letech se touto problematikou zabývala řada studií. Tyto studie byly v roce 2020 shrnuty v přehledovém článku publikovaném naší skupinou (Kloudova-Spalenkova *et al.* 2021). Součástí této kapitoly bude tedy stručné shrnutí založené zejména na tomto přehledovém článku a rozšířené o další doplňující publikace.

1.3.4.1 Hormonální terapie

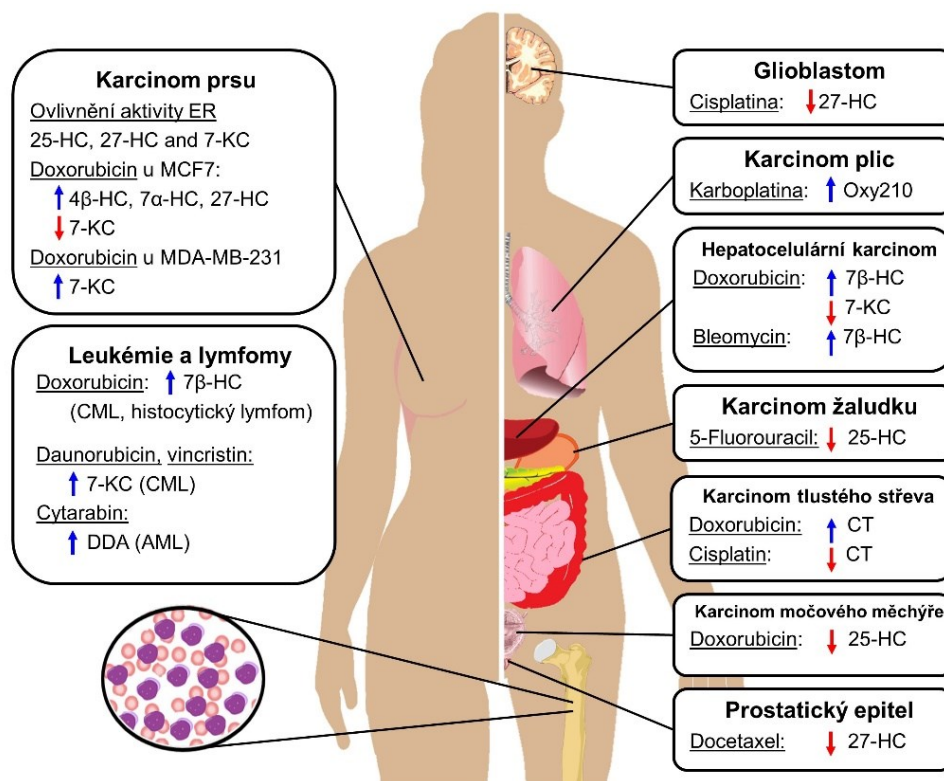
Prvním typem terapie, který může přítomnost oxysterolů ovlivňovat, je hormonální terapie karcinomu prsu. Princip tohoto ovlivnění byl naznačen již v kapitole 1.3.1, kde je popsáno ovlivnění aktivity ER. Toto ovlivnění je velmi dobře popsáno a charakterizováno pro 27-HC (He and Nelson 2017; Nelson 2018; Umetani *et al.* 2007), v menší míře potom pro 25-HC (Lappano *et al.* 2011) a jedna studie naznačuje aktivaci ER také u 7-KC (Wang *et al.* 2017a). V hormonální terapii je nejčastěji využívaným léčivem tamoxifen, který, stejně jako 27-HC, působí jako tzv. SERM. Oba se tedy vážou na molekulu estrogenového receptoru, ale zatímco tamoxifen jeho aktivitu snižuje, v důsledku vazby 27-HC dochází k aktivaci ER a vyšší buněčné proliferaci *in vitro* i *in vivo* (Nelson *et al.* 2013a). K protinádorovým účinkům tamoxifenu patří kromě vazby na ER také vazba na AEBS (viz. kapitola 1.3.1.6). Vazba tamoxifenu na AEBS, vzhledem k enzymatické aktivitě AEBS, způsobuje akumulaci α -EC a β -EC v buňce (de Medina *et al.* 2010). Na AEBS se mohou ale vázat také některé další oxysteroly, například 7-KC (Hwang and Matin 1989). U 7-KC i 25-HC však bylo zjištěno, že jsou schopny inhibovat vazbu tamoxifenu na AEBS (Lin and Hwang 1991).

1.3.4.2 Chemoterapie

V rámci protinádorové terapie patří vliv oxysterolů na chemoterapii k nejprostudovanějším kapitolám. Mezi cytostatiky je nejhojněji studovaným léčivem doxorubicin, jehož účinnost byla studována v řadě typů nádorů *in vitro*, přičemž různé oxysteroly měly na jeho účinnost rozdílný vliv (Obrázek 6). Účinnost doxorubicinu byla snížena v přítomnosti 25-HC u karcinomu močového měchýře (Wang *et al.* 2020a), snížena v přítomnosti 7-KC u buněk hepatocelulárního karcinomu (Wang *et al.* 2013) a ER pozitivní buněčné linie karcinomu prsu MCF-7 (Wang *et al.* 2017a), zatímco u ER negativní buněčné linie MDA-MB-231 7-KC účinnost doxorubicinu zvyšoval (Wang *et al.* 2017a). Zvýšená efektivita doxorubicinu byla dále pozorována v případě CT u kolorektálního karcinomu (Carvalho *et al.* 2010), 7 β -HC u hepatocelulárního karcinomu (Hyun *et al.* 2002), nebo 4 β -HC, 7 α -HC a 27-HC u ER pozitivního karcinomu prsu (Wang *et al.* 2017a). Na tomto výčtu je patrné, že skutečně záleží jak na konkrétním oxysterolu, tak na typu nádorové linie, kde je oxysterol studován. Mechanismy ovlivnění účinnosti doxorubicinu se v tomto kontextu budou jistě lišit. Ze jmenovaných studií se však mnoho z nich doposud na konkrétní mechanismus účinku nezaměřilo. Z prací, které se mechanismem naopak zabývaly, se většina z nich zaměřila na sledování exprese a/nebo aktivity ABC transportérů. Ve studii analyzující vliv oxysterolů na linie karcinomu prsu bylo zjištěno, že 7-KC zvyšuje expresi transportéru ABCB1/P-

glykoproteinu, který je zodpovědný za export doxorubicinu ven z buňky, což odpovídá pozorovanému snížení účinnosti doxorubicinu po inkubaci s 7-KC. Ostatní oxysteroly, které naopak zvyšovaly účinnost doxorubicinu, neměly na expresi ABCB1 a akumulaci doxorubicinu v buňkách vliv (Wang *et al.* 2017a). Také v případě snížení účinnosti doxorubicinu u buněk hepatocelulárního karcinomu byla zjištěna zvýšená aktivita ABCB1 v přítomnosti 7-KC (Wang *et al.* 2013). Na druhou stranu, v buněčných liniích chronické myeloidní leukemie došlo ke zvýšení účinnosti daunorubicinu a vinkristinu v přítomnosti 7-KC. Tato dvě cytostatika jsou také substrátem ABCB1, avšak na rozdíl od buněk karcinomu prsu, 7-KC expresi/aktivitu tohoto transportéru nezvyšoval a naopak došlo ke snížení (Fernandes *et al.* 2017). Třetím antracyklinem, který byl v tomto kontextu analyzován, je epirubicin a jeho účinnost u tzv. triple-negativního karcinomu prsu (TNBC, z angl. triple-negative breast carcinoma). V tomto případě došlo ke zvýšení rezistence buněk na epirubicin v přítomnosti 24-HC a 27-HC. Tento efekt byl zprostředkován skrze aktivaci LXR a v důsledku toho také vyšší aktivaci ABCB1. Výsledky získané v *in vitro* experimentech byly potvrzeny také *in vivo* na myších CDX modelech (Hutchinson *et al.* 2021).

Mezi dalšími studovanými cytostatiky můžeme zmínit cisplatinu, jejíž účinnost byla významně nižší v buněčné linii kolorektálního karcinomu za přítomnosti CT (Carvalho *et al.* 2010), nebo v modelových buněčných liniích glioblastomu preinkubovaných s 27-HC (Liu *et al.* 2019). *In vivo* studie analyzující vliv 27-HC v CDX modelu karcinomu ovaria zjistila, že přítomnost 27-HC přispívá k rezistenci těchto nádorů na terapii karboplatinou (He *et al.* 2019). 27-HC naopak snížil účinnost dalšího léčiva patřícího do skupiny taxanových derivátů, docetaxelu. V tomto případě bylo však snížení účinnosti potvrzeno na nemaligních buňkách epitelu prostaty (Raza *et al.* 2016). Mezi dalšími příklady lze uvést snížení citlivosti buněk karcinomu žaludku vůči 5-fluorouracilu (Wang *et al.* 2019b), či zvýšení účinnosti bleomycinu v přítomnosti 7 β -HC u buněčných linií hepatocelulárního karcinomu (Hyun *et al.* 2002). Jak již bylo řečeno, většina z těchto studií se však podrobněji nezaměřovala na mechanismy, jakými tyto oxysteroly ovlivňují účinnost cytostatik, proto zde tyto mechanismy nebudou více diskutovány.



Obrázek 6: Přehled vlivu jednotlivých oxysterolů na účinnost protinádorové terapie. Shrnutí studií, které analyzovaly význam přítomnosti oxysterolů na účinnost protinádorové terapie. Modrá šipka ukazuje na zvýšení účinnosti terapie v přítomnosti oxysterolu, červená šipka ukazuje na nižší účinek protinádorové léčby v přítomnosti daného oxysterolu. AML – akutní myeloidní leukemie, CML – chronická myeloidní leukemie. Obrázek byl převzat a upraven podle Kloudova-Spalenkova *et al.* (Kloudova-Spalenkova *et al.* 2021).

Další molekulou, kterou lze v tomto kontextu zmínit, je dendrogenin A (DDA), který není přímo oxysterolem, ale vzniká působením DDA syntázy z α/β -EC a histaminu. DDA obecně působí v buňkách jako tumor supresor. V literatuře popsáno potlačení účinku cytarabinu na buněčných modelech akutní myeloidní leukemie (Serhan *et al.* 2020) vlivem DDA pravděpodobně skrze aktivaci LXR β a indukci autofágie nádorových buněk (Poirot and Silvente-Poirot 2018), přičemž nemaligní buňky ovlivněny nebyly.

V neposlední řadě zde lze zmínit také snahu o vývoj nových, semi-syntetických oxysterolů, které by využily přirozených vlastností oxysterolů v modifikované podobě. Výchozí molekulou pro syntézu těchto oxysterolů byl 20 α ,22(R)-dihydroxycholesterol nazvaný také jako Oxy16, který je prokázaným inhibítozem Hh signalizace na modelu myších fibroblastů (Wang *et al.* 2017b). Modifikací Oxy16 bylo potom připraveno 70 strukturálních analogů, které byly otestovány a 2 nejslibnější oxysteroly – Oxy186 a Oxy210 – prokázaly schopnost inhibovat Hh signalizaci (Stappenbeck *et al.* 2019; Wang *et al.* 2017b). Oxy210 navíc inhiboval signalizaci TGF β , buněčnou proliferaci, EMT a invazivitu nádorových buněk. Jeho

kombinace s karboplatinou navíc prokázala zvýšenou účinnost oproti cytostatiku samotnému u modelu nemalobuněčného karcinomu plic *in vitro* (Stappenbeck *et al.* 2019). Vývoj a testování takovýchto sloučenin by tedy v budoucnu mohly přispět k rozvoji protinádorové terapie.

Na souvislost protinádorové terapie a účinku oxysterolů se můžeme podívat ale také z druhé strany – aplikace léčiv může ovlivňovat hladinu oxysterolů a tato změna může souviset s účinností léčby, jak ukázala analýza účinků inhibitoru steroidogeneze mitotanu (4,4'-dichlorodiphenyldichloroethan, komerční název Lysodren) na buněčné linii H295R, která je modelem pro studium karcinomu kůry nadledvin. Tento inhibitor, který se běžně užívá u pacientů s tímto typem onemocnění, způsobuje blokování syntézy cholesterolu a v důsledku toho také hromadění lanosterolu, prekursorů lanosterolu, ale také některých oxysterolů vznikajících neenzymatickou oxidací, jako je 7 β -HC, či 7-KC (Sbiera *et al.* 2015). Autoři studie Germano *et al.* však zjistili významné zvýšení hladiny také u enzymaticky vznikajícího oxysterolu, 27-HC. Tento jev pozorovali *in vitro* na buněčné linii H295R (4,5 \times vyšší hladina 27-HC), významně zvýšenou hladinu 27-HC však naměřili i plasmě pacientů po léčbě mitotaniem (3,6 \times vyšší hladina). Podíl zvýšení hladiny 27-HC na účinnosti mitotanu prokázali autoři studie v *in vitro* experimentu, kdy pozorovali stejný (cytotoxický a pro-apoptický) účinek na buňkách v přítomnosti mitotanu, či na buňkách inkubovaných pouze s 27-HC (Germano *et al.* 2020). Přesný mechanismus vzniku a účinku 27-HC v tomto případě zatím není znám.

Podobným příkladem je studie ukazující možný podíl oxysterolů na (v tomto případě) vedlejších účincích doxorubicinu. Analýza na myších kardiomyocytech HL-1 prokázala zvýšenou hladinu 7 α -HC, 7 β -HC, 7-KC, 24S-HC a 27-HC po inkubaci s doxorubicinem (Monzel *et al.* 2017). Zvýšení hladiny těchto oxysterolů tedy může souviset s kardiotoxicitou, která je s terapií doxorubicinem spojována.

1.3.4.3 Imunoterapie

V případě imunoterapie doposud neexistují přímé důkazy o jejím ovlivnění oxysteroly, avšak některé studie naznačují, že by některé mechanismy spojené s působením oxysterolů roli hrát mohly. Vliv oxysterolů na různé typy imunitních buněk je krátce shrnut v kapitole 1.3.3.

Mezi nepřímé důkazy ovlivnění imunoterapie můžeme zařadit například práci dokumentující zlepšení účinků imunoterapie inhibitory syntézy cholesterolu a oxysterolů u myších CDX modelů s lidskými nádorovými buňkami *in vivo* (Lanterna *et al.* 2016).

1.3.4.4 Radioterapie

Jako poslední typ protinádorové terapie je třeba zmínit radioterapii. I v této oblasti bylo publikováno několik málo prací spojujících radioterapii s účinky oxysterolů. V případě 25-HC byla zjištěna vyšší radiosenzitivita u leukemické buněčné linie L1210 (Gaffney *et al.* 1991) a podobné účinky měl i 7 β -HC na buněčné linie lymfomu RMD4 a karcinomu štítné žlázy K1 (Hyun *et al.* 2002).

1.3.5. Hladiny oxysterolů u onkologických pacientů

Vzhledem ke všem výše popsaným vlastnostem jsou oxysteroly potenciálně zajímavými biomarkery nejen v případě nádorových, ale také všech výše popsaných onemocnění, kde dochází k narušení rovnováhy a změnám hladiny jednotlivých oxysterolů (Zmyslowski and Szterk 2019). Jejich hladiny je možné měřit v různých typech vzorků. Mezi nejčastější patří detekce oxysterolů v plasmě či séru, případně mozkomíšním moku u neurodegenerativních onemocnění. Stanovení hladin lze však provádět přímo v cílových tkáních, včetně nádorových. Metodika stanovení hladiny oxysterolů zahrnuje kapalinovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (LC/MS, z angl. liquid-chromatography mass-spectrometry) nebo plynovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (GC/MS, z angl. gas-chromatography mass-spectrometry).

Jak metoda stanovení pomocí MS, tak samotná příprava vzorků pro tuto analýzu zahrnuje celou řadu protokolů a rozhodně se nejedná o uniformní metodu. Vzhledem k diverzitě použitých metod a zejména vzhledem k fyzikálním vlastnostem oxysterolů je ale stanovení hladiny obtížné a porovnání hodnot mezi jednotlivými laboratořemi nevychází konsistentně (Lütjohann *et al.*, 2018). Autoři nedávné studie rozeslali sérii vzorků séra nejprve do 9 a ve druhém roce do 11 různých laboratoří. Tyto laboratoře následně metodami vlastní volby (LC/MS i GC/MS) stanovily hladiny tří oxysterolů (24(S)-HC, 27-HC a 7 α -HC) v obdržených vzorcích. Získané hodnoty se v rámci mezilaboratorního porovnání významně lišily (Lütjohann *et al.* 2018). Při porovnávání výsledků z různých pracovišť je tedy potřeba na tento fakt brát zřetel a zároveň je nutné metody stanovení hladiny oxysterolů dále optimalizovat a standardizovat.

Hladinu oxysterolů navíc ovlivňuje velká řada dalších faktorů, jako je pohlaví, rasa, hodnota BMI, která inverzně koreluje s hladinou 4 β -HC, dále například kouření, či užívání alkoholu, které souvisí s vyšší hladinou 7 α -HC v cirkulaci, diabetes související s nižší hladinou 24-HC a 27-HC, ale také třeba užívání aspirinu, které je asociováno s nižší hladinou 25-HC nebo 4 β -HC (Passarelli *et al.* 2022).

Navzdory výše diskutovaným skutečnostem, v literatuře již existuje řada studií, jejichž autoři stanovovali hladiny oxysterolů u pacientů s nádorovým onemocněním, a to jak v cirkulaci, tak v nádorových tkáních. Souhrn těchto studií, včetně získaných výsledků, je v Tabulce 1 pro tekuté biopsie a v Tabulce 2 pro tkáně. V těchto studiích převládají analýzy zabývající se hladinami oxysterolů u pacientek s karcinomem prsu, objevují se ale také práce na dalších typech nádorů, zejména s výsledky analýz v nádorové tkáni karcinomu plic, štítné žlázy, žaludku, glioblastomu, či kolorektálního karcinomu. V cílových tkáních jsou nejvíce prostudovány hladiny 27-HC.

Obecně můžeme říci, že studie porovnávající vzorky nádorové s nemaligními kontrolními vzorky většinou zjistily vyšší hladiny oxysterolů v nádorové tkáni. Rovněž v plasmě nebo séru pacientů s nádory byly, v porovnání se vzorky zdravých jedinců, obvykle vyšší hladiny. Vyšší hladiny oxysterolů jsou spojovány s vyšším rizikem vzniku onemocnění, horší prognózou, metastatickým potenciálem, či pokročilejším stádiem (stage) nebo histologickým stupněm (grade) onemocnění. Výjimkou z tohoto pravidla jsou studie, které zjistily souvislost mezi vyšší hladinou 27-HC a nižším rizikem onemocnění karcinomem prsu u postmenopauzálních žen (Lu *et al.* 2019) a nižší hladinu DDA v nádorových vzorcích v porovnání s okolní nemaligní kontrolní tkání (de Medina *et al.* 2013). Toto zjištění však není překvapivé vzhledem k tomu, že, jak již bylo popsáno výše, účinky DDA jsou spíše tumor-supresorové. Oproti tomu OCDO (6-oxo-cholestan-3 β ,5 α -diol), který může vznikat z CT působením 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 2, působí v opačném směru jako tumor promotor a přispívá k růstu nádorů (Voisin *et al.* 2017). V souladu s touto premisou hladina OCDO je v nádorových vzorcích vyšší v porovnání s kontrolními tkáněmi (Voisin *et al.* 2017).

Další kategorií jsou potom studie analyzující hladiny oxysterolů ve vzorcích pacientů před a po zahájení terapie. Zde můžeme jmenovat dvě studie analyzující vzorky pacientek s karcinomem prsu. První studie zjistila sníženou hladinu 24-HC, 25-HC, 4 β -HC a 7 α -HC v cirkulaci pacientek 28 dní po zahájení léčby tamoxifenem a naopak zvýšenou hladinu 27-HC a β -EC u pacientek po zahájení léčby inhibitory aromatázy v porovnání s vzorky před léčbou (Dalenc *et al.* 2017). Druhá studie byla publikována skupinou z naší laboratoře a zjistila významně zvýšenou hladinu 7-KC ve vzorcích plasmy pacientek odebraných 1-2 roky po chirurgickém odstranění tumoru a zahájení terapie, ve většině případů hormonální, ve srovnání se vzorky od stejných pacientek před operací (Soucek *et al.* 2017). Obe studie jsou svým designem těžko porovnatelné, a tudíž je třeba se studiu tohoto fenoménu dále intenzivně věnovat.

Tabulka 1: Studie analyzující hladiny oxysterolů v cirkulaci onkologických pacientů. Upraveno podle Kloudova-Spalenkova *et al.* (Kloudova-Spalenkova *et al.*, 2021.)

Oxysterol	Typ nádoru	Typ vzorku	Charakteristika pacientů	Výsledek	Metoda	Reference
24-HC	Karcinom prsu	Sérum	29 pacientek	Snížená hladina po léčbě tamoxifenem	GC/MS	(Dalenc <i>et al.</i> 2017)
25-HC	Karcinom prsu	Sérum	29 pacientek	Vyšší hladina u pacientek s metastázami; snížená hladina po léčbě tamoxifenem	GC/MS	(Dalenc <i>et al.</i> 2017)
27-HC	Karcinom prsu	Sérum	66 pacientek a 18 nenádorových kontrol	Bez statisticky významného rozdílu	LC/MS	(Wu <i>et al.</i> 2013)
	Karcinom prsu	Sérum	42 pacientek	Žádná signifikantní asociace s ER α statusem, velikostí nádoru, nádorovým grade, či expresí Ki67	LC/MS	(Kimbung <i>et al.</i> 2017)
	Karcinom prsu	Sérum	530 pacientek a 1036 nenádorových kontrol	V případě vyšší hladiny 27-HC nižší riziko onemocnění u postmenopauzálních pacientek	LC/MS	(Lu <i>et al.</i> 2019)
	Karcinom prsu	Sérum	29 pacientek	Zvýšená hladina po léčbě inhibitory aromatázy	GC/MS	(Dalenc <i>et al.</i> 2017)
4 β -HC	Karcinom prsu	Sérum	29 pacientek	Snížená hladina po léčbě tamoxifenem	GC/MS	(Dalenc <i>et al.</i> 2017)
7 α -HC	Karcinom prsu	Sérum	29 pacientek	Snížená hladina po léčbě tamoxifenem	GC/MS	(Dalenc <i>et al.</i> 2017)
7 β -HC	Karcinom plic	Plasma	20 pacientů a 40 kontrolních nenádorových vzorků	V případě vyšší hladiny 7 β -HC vyšší riziko onemocnění	GC/MS	(Linseisen <i>et al.</i> 2002)
7-KC	Karcinom prsu	Plasma	24 pacientek	Zvýšená hladina po chirurgickém odstranění nádoru a zahájení terapie	LC/MS	(Soucek <i>et al.</i> 2017)
	Karcinom plic a karcinom rekta	Sérum	1 pacient s karc. rekta, 4 pacienti s karcinomem plic a směs séra nenádorových kontrol	Zvýšená hladina u pacientů s nádorovým onemocněním	GC/MS	(Saito <i>et al.</i> 1983)
OCDO	Karcinom prsu	Sérum	29 pacientek	Vyšší (ale nesignifikantní) hladina u pacientek s metastázami	GC/MS	(Dalenc <i>et al.</i> 2017)
α -EC	Karcinom pankreatu	Sérum	40 pacientů a 40 kontrolních nenádorových vzorků	Jeden z významně se lišících metabolitů mezi nádorovými a nemaligními vzorky (metabolomická studie)	LC/MS	(Di Gangi <i>et al.</i> 2016)
β -EC	Karcinom prsu	Sérum	29 pacientek	Zvýšená hladina po léčbě inhibitory aromatázy	GC/MS	(Dalenc <i>et al.</i> 2017)

Tabulka 2: Studie analyzující hladiny oxysterolů v nádorové tkáni pacientů. Upraveno a doplněno podle Kloudova-Spalenkova *et al.* (Kloudova-Spalenkova *et al.*, 2021).

Oxysterol	Typ nádoru	Typ vzorku	Charakteristika pacientů	Výsledek	Metoda	Reference
OCDO	Karcinom prsu	tumor, nenádorová okolní tkáň	16 pacientek	Vyšší hladina v nádorových vzorcích	GC/MS	(Voisin <i>et al.</i> 2017)
DDA	Karcinom prsu	tumor, nenádorová okolní tkáň	10 pacientek	Nižší hladina v nádorových vzorcích	LC/MS	(de Medina <i>et al.</i> 2013)
24(R/S),25-EC	Karcinom žaludku	tumor, nenádorová okolní tkáň	19 pacientů	Zvýšená hladina v nádorových vzorcích	LC/MS	(Guo <i>et al.</i> 2018)
25-HC	Karcinom močového měchýře	tumor, nenádorová okolní tkáň	157 pacientů	Zvýšená hladina v nádorové tkáni, asociace s celkovým přežíváním	LC/MS	(Wang <i>et al.</i> 2020a)
27-HC	Kolorektální karcinom	tumor, nenádorová okolní tkáň	26 pacientů	Zvýšená hladina u nádorů vyššího stádia (stage III)	LC/MS	(Rossin <i>et al.</i> 2019)
	Karcinom žaludku	tumor, nenádorová okolní tkáň	19 pacientů	Zvýšená hladina v nádorových vzorcích	LC/MS	(Guo <i>et al.</i> 2018)
	Glioblastom	tumor	37 pacientů	Vyšší hladina asociovaná s horší prognózou pacientů	LC/MS	(Liu <i>et al.</i> 2019)
	Karcinom prsu	tumor, nenádorová okolní tkáň, kontrolní zdravá tkáň	66 pacientek, 18 nenádorových kontrol	Hladina v nádoru > v okolní tkáni > ve zdravých vzorcích	LC/MS	(Wu <i>et al.</i> 2013)
	Karcinom štítné žlázy	benigní tumor vs. papilární karcinom vs. anaplastický karcinom	40 benigních tumorů, 30 nízcce/středně rizikových, 18 vysoce rizikových, 9 anaplastických karcinomů	Hladina v anaplastických karcinomech významně vyšší v porovnání s benigními a nízcce rizikovými tumory	LC/MS	(Revilla <i>et al.</i> 2019)
	Karcinom plic	tumor, nenádorová okolní tkáň	9 adenokarcinomů, 15 dlaždicobuněčný karcinom	Hladina v nádorové tkáni je vyšší v porovnání s nemaligními kontrolami v případě obou typů karcinomů. Hladina v dlaždicobuněčném karcinomu vyšší oproti adenokarcinomu. Hladina u grade III vyšší v porovnání s grade I a II	LC/MS	(Takada <i>et al.</i> 2022)

2. Cíle práce

Všechny výše popsané studie jasně dokládají, že oxysteroly jsou významnými hráči na poli nádorové biologie. Jejich přítomnost nebo deregulace hladin může mít významný vliv na osudy nádorové buňky. Zároveň ale zbývá mnoho skutečností, které je potřeba hlouběji prozkoumat a objasnit, abychom o úloze oxysterolů (nejen) u nádorových onemocnění měli ucelenější obraz. Z tohoto důvodu byl jako téma předkládané dizertační práce zvolen vliv oxysterolů na průběh karcinomu prsu.

Tato dizertační práce si klade za cíl tři hlavní úkoly:

1) **Expresní analýza faktorů oxysterolové dráhy u pacientek s karcinomem prsu**

Prvním z úkolů bylo stanovení exprese vybraných genů kódujících především enzymy zajišťující syntézu oxysterolů a jejich další metabolismus v buňkách, transportéry oxysterolů, cholesterolu a dalších lipidových molekul, a dále také další proteiny interagující s oxysteroly, např. transkripční faktory LXR, proteiny SREBP a INSIG, či proteiny z rodiny OSBP. Expese těchto faktorů byla následně porovnána s klinicko-patologickými daty pacientek s karcinomem prsu za účelem nalezení potenciálních prognostických či prediktivních markerů u tohoto onemocnění.

2) **Analýza hladiny vybraných oxysterolů v plasmě pacientek s karcinomem prsu**

Druhým cílem byla analýza oxysterolů v plasmě pacientek s karcinomem prsu a zhodnocení jejich prognostického významu. Vzhledem k tomu, že studie hladin oxysterolů u pacientů s onkologickým onemocněním jsou v současné době spíše v počátcích a jejich výsledky zatím nejsou komplexní a jednoznačné, je potřeba tyto analýzy dále rozšiřovat v dalších studiích. Předkládaný projekt si kladl za cíl stanovit hladinu sedmi vybraných oxysterolů u pacientek s ER pozitivním typem karcinomu prsu a následné statistické porovnání těchto hladin s klinicko-patologickými daty těchto pacientek.

3) ***In vitro* studie účinků 7-ketocholesterolu na buněčných liniích karcinomu prsu lišících se expresí ER – vliv na účinky tamoxifenu**

Poslední část této práce se zabývala analýzou jednoho vybraného oxysterolu – 7-ketocholesterolu. Tento oxysterol byl vybrán na základě dříve publikované studie z naší laboratoře (Soucek *et al.* 2017), kde právě hladina 7-KC vyšla jako signifikantně zvýšená u

pacientek po chirurgickém odstranění nádoru a zahájení (většinou) hormonální terapie. Vzhledem k této skutečnosti jsme se rozhodli prostudovat právě vliv 7-KC na ER pozitivní i ER negativní buněčné linie *in vitro*, jeho vliv na buněčnou viabilitu, buněčný cyklus, migraci a invazivitu a především také jeho vliv na účinnost tamoxifenu, který se v terapii pacientek s karcinomem prsu hojně užívá v rámci hormonální terapie. Dále jsme prostudovali vliv 7-KC na expresní hladiny vybraných genů a proteinů oxysterolové signalizace.

3. Materiály a metody

3.1 Vzorky plasmy a tkání od pacientek s karcinomem prsu

Do první studie zabývající se hladinami genové exprese byly zahrnuty vzorky od celkem 193 pacientek s karcinomem prsu diagnostikovaným v Nemocnici Atlas ve Zlíně a ve Fakultní nemocnici v Motole mezi lety 2002 – 2012. Kritériem pro zařazení do studie byla histologicky potvrzená diagnóza karcinomu prsu a informovaný souhlas pacientky. V rámci chirurgického odstranění nádoru byla část tkáně odebrána pro potřeby studie a takto odebraný vzorek byl bezprostředně zamražen a uložen při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího zpracování. Pro porovnání exprese mezi nádorovou a nenádorovou tkání bylo ve studii využito také několik vzorků nemaligní okolní tkáně taktéž odebrané v rámci chirurgické operace stejným pacientkám.

Do druhé studie zabývající se hladinou oxysterolů v plasmě bylo zahrnuto 58 pacientek s ER pozitivním karcinomem prsu, jenž jim byl diagnostikován ve Fakultní nemocnici v Motole v období 2003–2011. Vzorky krve byly pacientkám odebrány vždy den před chirurgickým odstraněním nádoru. Do studie byly zařazeny pouze pacientky bez předchozí (neoadjuvantní) terapie po vyjádření informovaného souhlasu s účastí ve studii. Vzorky krve určené pro separaci plazmy byly odebrány do zkumavek s EDTA, která brání srážení krve. Separace plazmy byla provedena v nejkratším možném čase po odebrání vzorku, zpravidla do 2 hodin od odběru. Vzorky krve byly následně centrifugovány ($1000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), rozděleny do 3 alikvotů, které byly uloženy při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího zpracování.

V případě obou studií byla současně se vzorky shromažďována také klinicko-patologická data pacientek, která budou podrobněji specifikována v kapitole 3.1.1.

3.1.1 Klinicko-patologická data

Mezi údaje o pacientkách a jejich diagnóze, které byly následně porovnávány s našimi výsledky, patřily:

- 1) **Věk ženy v době diagnózy**
- 2) **Menopauzální status ženy v době diagnózy**
- 3) **Histologický typ tumoru**

Nejčastějším typem je karcinom duktální, který vzniká v mlékovodech (duktech). Duktální karcinom potom může být invazivní (IDC), nebo *in situ* (DCIS). Dalším typem je potom karcinom lobulární, který zasahuje žlázoové lalůčky a můžeme jej opět rozdělit na invazivní lobulární karcinom (ILC) a lobulární karcinom *in situ* (LCIS). Mezi další, méně běžné

karcinomy prsu, které byly zařazeny do našich studií, potom patří karcinom mucinózní (charakterizovaný akumulací extracelulárního mucinu), papilární, tubulární či smíšený.

4) Stádium nádoru, TNM klasifikace

K popisu rozsahu nádorového onemocnění slouží tzv. TNM klasifikace. Ta je jednak klinická (TNM), která se určuje na základě klinického vyšetření lékařem a pomocí zobrazovacích metod, a jednak patologická (pT, pN, pM), kterou provádí patolog na základě vyšetření nádoru. Jedná se o rozdělení z hlediska přítomnosti a velikosti primárního nádoru (pT), zasažení regionálních lymfatických uzlin (pN) a přítomnost vzdálených metastáz (pM). Konkrétní parametry popisovaných vlastností ukazuje Tabulka 3.

Tabulka 3 – Patologická TNM klasifikace nádorů prsu. Upraveno podle Sobin *et al.* (Sobin *et al.*, 2011).

pT - Primární nádor	
pTX	primární nádor nelze hodnotit
pT0	bez známek primárního nádoru
pTis	karcinom <i>in situ</i>
pT1	nádor do 2 cm v největším rozměru
pT2	nádor větší než 2 cm, ne však více než 5 cm v největším rozměru
pT3	nádor větší než 5 cm v největším rozměru
pT4	nádor jakékoli velikosti s přímým šířením do stěny hrudní a/nebo do kůže
pN - Regionální mízní uzliny	
pNX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
pN0	regionální mízní uzliny bez metastáz
pN1	mikrometastázy; nebo metastázy v 1-3 stejnostranných axilárních mízních uzlinách; a/nebo v stejnostranných vnitřních mamárních mízních uzlinách s mikroskopickými metastázami detekovanými z biopsie sentinelové mízní uzliny; avšak klinicky neprokazatelné
pN	metastázy v 4-9 stejnostranných axilárních mízních uzlinách, nebo v klinicky zjevných stejnostranných vnitřních mamárních mízních uzlinách (uzlině) bez metastáz v axilárních mízních uzlinách
pN3	metastázy dle níže uvedeného popisu: pN3a metastázy v 10 a více axilárních mízních uzlinách (alespoň jedna metastáza je větší než 2 mm); nebo metastázy v infraklavikulárních mízních uzlinách; pN3b metastázy v klinicky zjevné vnitřní mamární uzlině s přítomností pozitivní axilární mízní uzliny; nebo metastázy ve více než 3 axilárních mízních uzlinách a s mikro nebo makrometastázami ve vnitřních mamárních uzlinách zjištěných při biopsii sentinelové uzliny; klinicky neprokazatelných; pN3c metastázy v stejnostranné supraklavikulární mízní uzlině (uzlinách)
pM - Vzdálené metastázy	
pMX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
pM0	bez vzdálených metastáz
pM1	vzdálené metastázy

TNM klasifikace dále slouží k určení stádia nádoru, nazývaného často také anglicky jako nádorový stage/staging. Tuto klasifikaci podrobněji popisuje Tabulka 4.

Tabulka 4 – Klasifikace stádia nádoru dle TNM. *mikrometastázy. Upraveno podle Sobin *et al.* (Sobin *et al.* 2011)

Rozdělení do stádií - Stage			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T0, T1	N1mi*	M0
Stadium IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	jakékoliv T	N3	M0
Stadium IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

5) Stupeň diference/grade

Další charakteristikou nádorů je stupeň diference, či také nádorový grade/grading, který se u nádorů prsu stanovuje pomocí tzv. Nottinghamské klasifikace (Elston and Ellis 1991). Ta zohledňuje tři parametry – 1) tvorbu tubulů, 2) jaderný pleomorfismus a 3) počet mitóz. Každý z těchto parametrů je ohodnocen 1 – 3 body a na základě součtu těchto bodů je potom dle výsledného skóre stanoven stupeň diference, jak ukazuje Tabulka 5. Čím vyšší je grade, tím méně jsou nádorové buňky diferencované.

Tabulka 5 – Stanovení stupně diference nádoru dle Nottinghamské klasifikace.

G1	3 - 5 bodů
G2	6 - 7 bodů
G2	8 - 9 bodů

6) Přítomnost ER, PR, HER2

Mezi běžně stanovované faktory u nádorů prsu patří také imunohistochemické vyšetření na přítomnost hormonálních receptorů - estrogenového receptoru α (ER) a progesteronového receptoru (PR), a dále receptoru pro lidský epidermální růstový faktor 2 (HER2, z angl. human epidermal growth factor receptor 2). Údaje o expresi těchto receptorů jsou nezbytnou součástí při výběru vhodné terapie (hormonální terapie, monoklonální protilátky), ale také významným prognostickým faktorem.

7) Exprese Ki67, molekulární subtyp karcinomu prsu

Kromě receptorových proteinů se v nádorové tkáni sleduje také hladina proteinu Ki67, který bývá také označován jako marker proliferační aktivity. Jeho nízká (< 14 %) či vysoká (≥ 14 %) hladina je potom společně s expresí receptorů využívána ke stanovení molekulárních subtypů karcinomu prsu, jak ukazuje Tabulka 6.

Tabulka 6 – Molekulární subtypy karcinomu prsu. Upraveno podle do Nascimento and Otoni (do Nascimento and Otoni, 2020).

	ER	PR	HER2	Hladina Ki67
Luminal A	pozitivní	pozitivní	negativní	nízká
Luminal B	pozitivní	negativní	negativní	vysoká
	pozitivní	pozitivní/negativní	pozitivní	nízká/vysoká
HER2+	negativní	negativní	pozitivní	vysoká
Triple negative	negativní	negativní	negativní	vysoká

V rámci předkládaných studií jsme údaje o expresi Ki67 a subtypu nádoru do našich analýz zahrnuli, avšak vzhledem k tomu, že v době, kdy byly vzorky krve a nádorové tkáně získávány, nebylo imunohistochemické stanovení exprese Ki67 rutinní praxí, tyto údaje u řady nádorů zařazených do studie chybí a také data o konkrétním subtypu jsou neúplná.

8) Léčba

Posledním klinicko-patologickým údajem, který jsme v rámci našich studií porovnávali, byla indikovaná terapie. V našich studiích jsme se zaměřili zejména na porovnání terapie tamoxifenem, který je stále nejběžněji využívaným lékem v rámci hormonální terapie u ER/PR pozitivních tumorů, ať už samostatně, nebo v kombinaci s inhibitory aromatázy, které taktéž spadají do kategorie hormonální léčby. V první předkládané studii jsme zahrnuli také pacientky léčené konvenční chemoterapií, a to jak v kombinaci s hormonální terapií, tak samostatně. Konkrétní druh podané chemoterapie jsme v rámci naší studie nerozlišovali, jednalo se však například o režimy CMF (cyklofosfamid, methotrexát, fluorouracil), FAC (fluorouracil, adriamycin, cyklofosfamid), AC (adriamycin, cyklofosfamid), FEC (fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid), či taxanové deriváty.

3.2 Homogenizace tkání a izolace RNA z tkání patientek s karcinomem prsu

Vzorky tkání byly vyjmuty z hlubokomrazicího boxu -80 °C, mechanicky homogenizovány v misce s tloučkem pod tekutým dusíkem a přeneseny do 1 ml TRIzol Reagent

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Izolace RNA proběhla dle manuálu výrobce. Izolovaná RNA byla rozpuštěna v 20–40 µl vody bez nukleáz (NFW, z angl. nuclease-free water), rozdělena do alikvotů a následně uložena při -80 °C.

3.3 Měření koncentrace, kontrola kvality vzorků, syntéza cDNA

Stanovení koncentrace RNA proběhlo pomocí kitu Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Invitrogen) dle manuálu výrobce a fluorescence byla změřena na přístroji Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Kontrola kvality RNA byla provedena stanovením RIN (z angl. RNA integrity number) pomocí kitu Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Z takto zkontrolované RNA byla následně pomocí reverzní transkripce nasyntetizována cDNA s využitím kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) dle manuálu výrobce. Na základě koncentrace RNA byl pro syntézu cDNA vždy využit takový objem vzorku, který odpovídal 0,5 µg vstupní RNA. Na takto připravené cDNA proběhla kontrola kontaminace vzorku genomovou DNA s využitím primerů navržených přes intronovou sekvenci genu pro ubiquitin C (Soucek *et al.* 2005). Vzorky cDNA bez kontaminace DNA byly před analýzou genové exprese preamplifikovány pomocí kitu TaqMan PreAmp Master Mix Kit (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) dle pokynů výrobce.

3.4 Stanovení genové exprese

Pro analýzu genové exprese byla využita kvantitativní PCR reakce v reálném čase (tzv. quantitative real-time PCR, nebo qPCR) s využitím TaqMan Gene Expression Master Mixu a TaqMan Gene Expression Assays (Life technologies Corp.) obsahujících specificky navržené sondy s primery pro každý gen. Ve studii byla analyzována exprese 73 genů, z čehož 3 geny (*EIF2B1*, *UBB*, *ELF1*) byly použity jako referenční k normalizaci genové exprese. Seznam všech testovaných genů včetně ID čísel pro všechny TaqMan Assays je součástí Přílohy 1. Výběr genů pro stanovení exprese byl proveden za pomoci databází KEGG (<http://www.kegg.jp>), LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>) a GeneCards (<http://genecards.org>). Pro všechny TaqMan Assays byla před samotným měřením stanovena účinnost qPCR reakce, která se ve všech případech pohybovala mezi 90-100 %. Relativní genová exprese byla stanovena na 384-jamkových destičkách v přístroji ViiA7 (Life Technologies Corp.). Celý proces qPCR v naší laboratoři probíhal v souladu s kritérii MIQE

(The Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments) (Bustin *et al.* 2009).

3.5 Příprava vzorků plasmy a extrakce oxysterolů

Pro extrakci neesterifikovaných oxysterolů z plasmy pacientek byla využita metoda podle Helmschrodt *et al.* (Helmschrodt *et al.* 2013). Vzorky plasmy byly rozmrazeny a centrifugovány ($3200 \times g$, 5 min, při laboratorní teplotě). 80 μ l plasmy bylo smícháno se směsí sedmi deuterovaných oxysterolů, rozpuštěných v methanolu, které sloužily jako vnitřní standardy – 25-hydroxycholesterol-d6, 27-hydroxycholesterol-d6, 7-ketocholesterol-d7, 7 α -hydroxycholesterol-d7, cholesterol-5 α ,6 α -epoxid-d7, cholesterol-5 β ,6 β -epoxid-d7 a cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol-d7 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). Všechny testované vzorky obsahovaly 400 pg každého deuterovaného oxysterolu. Jako negativní kontrola byl použit vzorek methanolu bez směsi oxysterolů. Ke každému takto připravenému vzorku bylo přidáno 1,44 ml extrakční směsi – methanol:isopropanol v poměru 1:1 (v/v). Vzorky byly 1 min důkladně promíchány na vortexu následně centrifugovány ($12\,500 \times g$, 10 min, při laboratorní teplotě). Supernatant byl přenesen do skleněných, tmavě zbarvených, zkumavek a následně odpařen proudem plynného dusíku za omezeného přístupu světla. Zkumavky s odparky byly naplněny argonem a uloženy při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Všechny roztoky použité při extrakci oxysterolů (methanol, extrakční směs) obsahovaly 0,05% butylovaného hydroxytoluenu, který slouží jako antioxidační činidlo pro prevenci autooxidace vzorků během přípravy.

3.6 Stanovení hladiny oxysterolů pomocí hmotnostní spektrometrie

Odparky připravené v kapitole 3.5 byly následně zabaleny a na suchém ledu odeslány do laboratoře profesora Fredericka Petera Guengeriche (Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA), kde proběhla analýza hladin jednotlivých oxysterolů pomocí kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie (LC/MS/MS).

Odparky zde byly rozpuštěny ve směsi methanol:voda v poměru 3:1 (v/v) a centrifugovány ($3220 \times g$, 5 min, při laboratorní teplotě). Jednotlivé oxysteroly byly následně rozlišeny metodou UPLC (z angl. ultra performance liquid chromatography) při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ na oktadecylsilanové (C18) koloně (Acquity BEH 1,7 μ m; 1 mm \times 100 mm) (Waters, Milford, MA, USA). Mobilní fází byla směs rozpouštědel voda/methanol/acetonitril v poměru 30:3,5:66,5 (v/v/v). Toto nastavení se udržovalo po dobu 1 minuty, následně byla změněna

mobilní fáze na směs methanol/acetonitril v poměru 5:95 (v/v). Analýza za těchto podmínek probíhala po dobu 4 min s lineárním gradientem s rychlostí průtoku 0,16 ml/min. Navazující metodou byla MS/MS analýza, která byla provedena za využití APCI (z angl. atmospheric pressure chemical ionization) v pozitivním módu. Naměřené hodnoty činily: m/z 367,2 a 385,2 (25-HC), m/z 367,2 a 385,2 (27-HC), m/z 367,2 a 385,2 (7 α -HC), m/z 383,2 a 401,2 (7-KC), m/z 105,1, 367,5 a 385,5 (α -EC), m/z 105,1, 367,5 a 385,5 (β -EC), m/z 105,1, 367,5 a 385,5 (CT) pro nedeuterované oxysteroly. Pro deuterované oxysteroly byly hodnoty m/z 373,2 a 391,2 (d6-25-HC), m/z 373,2 a 391,2 (d6-27-HC), m/z 374,2 a 392,2 (d7-7 α -HC), m/z 390,2 a 408,2 (d7-7-KC), m/z 105,2, 374,6 a 392,6 (d7- α -EC), m/z 105,2, 374,6 a 392,6 (d7- β -EC), m/z 105,2, 374,6 a 392,6 (d7-CT). Objem nástřiku na kolonu byl 20 μ l. Kvantifikace byla provedena metodou izotopového poměru s vnitřními standardy. Limit kvantifikace (LOQ) pro oxysteroly ve vzorcích plazmy byl 0,05 ng.

3.7 Buněčné kultury

V rámci *in vitro* studie byla analýza prováděna na dvou ER pozitivních (MCF-7, T47D) a jedné ER negativní (BT-20) buněčné linii karcinomu prsu. Tyto linie byly zakoupeny od firmy CLS (Cell Lines Service, Eppenheim, Německo). Buněčné linie MCF-7 a BT-20 byly pěstovány na kultivačním médiu Eagle's MEM (PAN-Biotech, Aidenbach, Německo) a linie T47D potom na kultivačním médiu RPMI 1640 obohaceném o pyruvát sodný (1 mM) a HEPES (15 mM). Obě média byla dále doplněna antibiotiky (penicilinem 100 U/ml a streptomycinem 100 μ g/ml) a 10 % fetálního bovinního séra (PAN-Biotech). Buňky byly kultivovány při 37 °C v inkubátoru s 5% CO₂ a pravidelně kontrolovány na přítomnost bakterií rodu *Mycoplasma* pomocí MycoAlert mycoplasma detection kit (Lonza, Basel, Švýcarsko). Autenticita buněčných linií byla ověřena pomocí STR analýzy.

Pro snížení estrogenních účinků klasického kultivačního média byly buněčné linie tři dny před všemi experimenty kultivovány na médiu bez obsahu fenolové červeně (Eagle's MEM od společnosti PAN-Biotech a RPMI 1640 od společnosti Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Toto médium bylo doplněno 5 % fetálního bovinního séra ošetřeného aktivním uhlím tak, aby bylo dosaženo minimálního obsahu steroidních hormonů. Na tomto médiu byly následně prováděny všechny experimenty.

3.8 Analýza stability 7-ketocholesterolu v kultivačním médiu

Pro ověření stability 7-KC v médiu za kultivačních podmínek (37 °C, 5% CO₂) byla provedena analýza stability tohoto oxysterolu po dobu 72 hodin. Buňky (MCF-7, T47D, BT-

20) byly sklizeny (trypsinizace), připraveny v počtu 5×10^3 buněk/jamka do 96-jamkové destičky a ponechány adherovat přes noc. Druhý den bylo kultivační médium vyměněno za médium obsahující 10 μM 7-KC, v případě buněčné linie T47D byla přidána ještě 5 μM koncentrace, která odpovídala koncentraci použité v případě všech experimentů. Vzorky o objemu 100 μl média byly následně odebírány v časech 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48 a 72 hodin. Kultivační médium (Eagle's MEM, RPMI 1640) bez 7-KC bylo odebráno jako kontrola. Takto odebrané vzorky byly do další analýzy uloženy při $-80\text{ }^\circ\text{C}$. V rámci další analýzy byly vzorky rozmrazeny, k 10 μl média byl přidán deuterovaný 7-KC (800 pg/vzorek) jako vnitřní standard a následná příprava vzorků a měření hladiny 7-KC probíhaly stejně jako v případě vzorků plasmu, jak je popsáno v kapitole 3.5 a 3.6.

3.9 Stanovení buněčné viability a proliferace

Pro studium vlivu 7-KC na buněčnou viabilitu byly buněčné linie nasazeny na 96-jamkovou destičku v počtu 5×10^3 buněk/jamka. Druhý den byl k buňkám přidán 7-KC v různých koncentracích (ředicí řada) a buňky byly inkubovány po dobu 72 hodin. Následně byl k buňkám přidán kit CellTiter-Blue cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA) a po dvou hodinách byla buněčná viabilita stanovena prostřednictvím změření fluorescence na přístroji Infinite M200 (Tecan).

Pro analýzu vlivu 7-KC na účinnost tamoxifenu (TAM) byla následně provedena stejná analýza také pro toto léčivo. Ředicí řada TAM byla k buňkám přidána jednak samostatně pro zjištění IC_{50} samotného TAM, a jednak v médiu obsahujícím nízké (subletální) koncentrace 7-KC (5, 10 a 15 μM pro MCF-7 a BT-20 a 2,5, 5 a 7,5 μM pro T47D). Ve všech experimentech byla po 72 hodinách inkubace hodnocena viabilita stejným způsobem jako v případě 7-KC. Všechny experimenty byly nezávisle opakovány třikrát.

Pro ověření zjištěných výsledků byla následně provedena analýza buněčné proliferace v přítomnosti TAM, 7-KC, nebo jejich kombinace (TAM+7-KC) v reálném čase na přístroji xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s využitím destiček E-plates 16 (ACEA Biosciences). Na tyto destičky bylo nasazeno 5×10^3 buněk/jamka v případě MCF-7 a BT-20, a 10×10^3 buněk/jamku pro T47D. Buňky byly takto inkubovány po dobu 18 hodin, následně bylo přidáno čerstvé kultivační médium (kontrola), nebo čerstvé médium obsahující TAM, 7-KC nebo jejich kombinaci. Pro tento experiment byly vybrány koncentrace, které při analýze hodnot IC_{50} vykazovaly statisticky významné změny u buněk MCF-7 a BT-20, tedy 10 μM obou látek pro buňky MCF-7 a BT-20 a analogicky 5 μM

pro buněčnou linii T47D. Proliferace byla sledována měřením impedance po dobu 72 hodin. Pro každou buněčnou linii byly provedeny tři nezávislé experimenty.

3.10 Analýza kaspázové aktivity

Všechny buněčné linie byly v počtu 5×10^3 buněk/jamka nasazeny do 96-jamkové destičky. Druhý den bylo k buňkám přidáno čisté kultivační médium (kontrola), médium s TAM, 7-KC nebo kombinací obou látek. Aktivace kaspáz 3 a 7 byla testována pomocí kitu Caspase-Glo 3/7 Assay System (Promega) s měřením luminiscence na přístroji Infinice M200 (Tecan). V rámci studie byly pro každou linii provedeny 3 nezávislé experimenty.

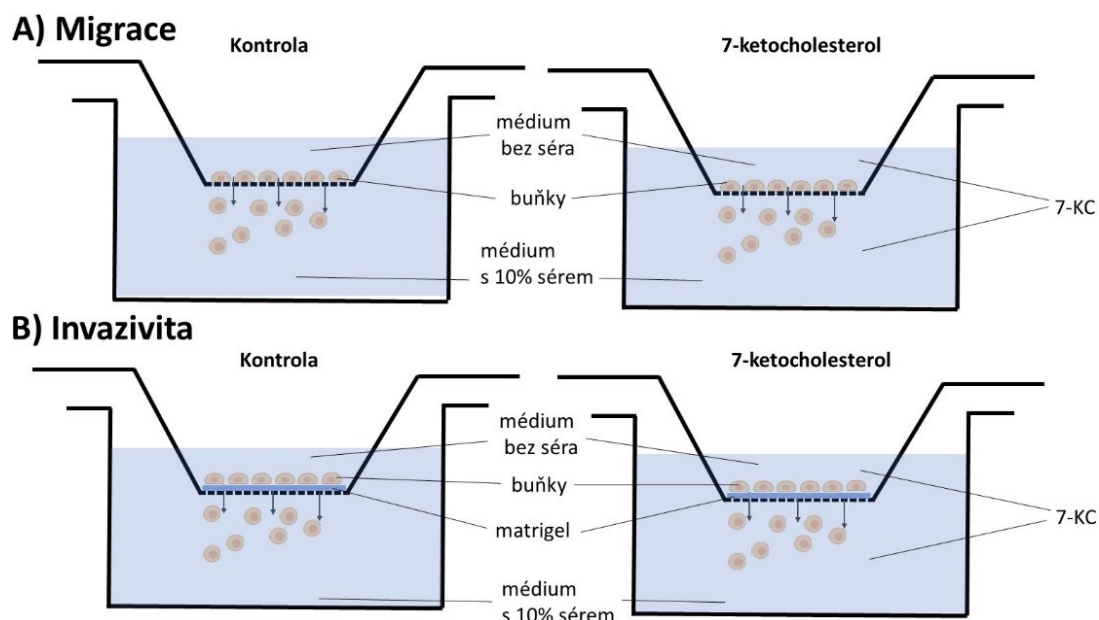
3.11 Studium změn v buněčném cyklu

Buňky byly nasazeny (5×10^5 buněk na 60 mm Petriho misku) a ponechány adherovat do druhého dne. Následně bylo k buňkám přidáno čerstvé kultivační médium (kontrola), TAM, 7-KC a nebo kombinace obou látek. Takto inkubované buňky byly následně sklizeny (trypsinace) v časech 24, 48 a 72 hodin od inkubace s testovanou látkou. Koncentrace obou látek byla $10 \mu\text{M}$ pro MCF-7 a BT-20 a $5 \mu\text{M}$ pro buňky T47D. Buňky byly po sklizení následně dvakrát promyty fosfátovým pufrům (PBS), centrifugovány ($450 \times g$, 10 min, 4°C) a peleta byla následně zafixována 70% ethanolem. Vzorky byly uchovány při 4°C do druhého dne. Poté byly buňky dvakrát promyty PBS a obarveny roztokem propidium jodidu ($50 \mu\text{g/ml}$ propidium jodidu, $60 \mu\text{g/ml}$ NaCl, $100 \mu\text{g/ml}$ RNázy a 10 mM Tris v ultračisté vodě Milli-Q). Buněčný cyklus byl analyzován průtokovým cytometrem BD FACSVersé (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). U každého vzorku bylo změřeno 20 000 událostí/buněk. Data byla analyzována pomocí softwaru FACSuite (Becton Dickinson). Každý experiment byl proveden ve dvou nezávislých měřeních. Příprava vzorků pro analýzu a následná analýza byla prováděna ve spolupráci s Ing. Marií Ehrlichovou z Oddělení toxikogenomiky, SZÚ.

3.12 Analýza buněčné migrace a invazivity

Buněčná migrace byla sledována na přístroji xCELLigence RTCA DP s migračními destičkami CIM-plates 16 (ACEA Biosciences). Spodní komůrka destičky CIM-plate 16 byla naplněna médiem s 10 % séra ošetřeného aktivním uhlím jako chemoatraktant (Obrázek 7). Buňky (4×10^4 buněk na jamku) v médiu bez séra byly nasazeny do horní komůrky na destičce. V kontrolních vzorcích byly buňky inkubovány pouze s čistým kultivačním médiem, kdežto vzorky s 7-KC obsahovaly tento oxysterol jak v horní, tak v dolní komůrce.

Analýza buněčné invazivity probíhala identicky. Jediným rozdílem bylo pokrytí migrační destičky 20 μ l Matrigelem o koncentraci 800 μ g/ml (Corning, NY, USA). Všechny experimenty byly opakovány nezávisle třikrát.



Obrázek 7: Schéma experimentu pro sledování buněčné migrace (A) a invazivity (B).

3.13 Příprava vzorků z buněčných linií pro stanovení genové exprese

Buňky byly nasazeny (5×10^5 buněk na 60 mm Petriho misku) a ponechány adherovat do druhého dne. Následně bylo k buňkám přidáno čisté médium (kontrola), TAM, 7-KC nebo kombinace obou látek. Koncentrace TAM a 7-KC byla 10 μ M u buněčných linií MCF-7 a BT-20 a 5 μ M u buněčné linie T47D. Buňky byly po 12, 24 a 48 hodinách inkubace sklizeny (trypsinace), dvakrát promyty PBS a resuspendovány v RLT pufru, který je součástí kitu AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Ten byl použit pro následnou izolaci RNA, DNA i proteinu ze všech sklizených vzorků dle manuálu výrobce. Vzorky pro analýzu rozdílů v genové expresi byly připraveny ve třech nezávislých experimentech.

Měření koncentrace, kontrola RNA a syntéza cDNA byly následně provedeny stejně jako v případě patientských vzorků, jak bylo popsáno v kapitole 3.3. U vzorků z buněčných linií byla následně stanovena exprese 3 referenčních genů (*EIF2B1*, *IPO8* a *MRPL19*) a 36 genů kódujících enzymy z metabolismu TAM (Brauch *et al.* 2009), metabolismu 7-KC (*HSD11B1*, *HSD11B2*, *SOAT1*), markery oxidačního stresu (*SOD1*, *SOD2* a *GPX1*), ABC transportéry (*ABCB1* a *ABCC2*), intracelulární receptory (*LXRA*, *LXRB*, *ESR1* a *ESR2*), geny kódující AEBS

(*DHCR7*, *EBP*) a vybrané onkodrivery (*TP53* a *MKI67*). Hladina exprese vybraných genů byla stanovena stejně jako v případě patientských vzorků, jak je popsáno v kapitole 3.4, ovšem v případě vzorků z buněčných kultur nebyla cDNA preamplifikována.

3.14 Western blotting

Vzorky proteinu z buněčných linií byly extrahovány pomocí AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitu, jak bylo popsáno v předchozí kapitole 3.13. Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí kitu PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) a měření absorbance na přístroji Infinice M200 (Tecan).

Pro analýzu proteinové exprese v buněčných liniích bylo použito v případě každého vzorků 20 μ g celkového proteinu. Proteiny byly rozděleny na základě molekulové velikosti pomocí elektroforézy v přítomnosti SDS v 10% polyakrylamidovém gelu a poté přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Membrány byly 60 minut blokovány v blokačním činidle BlockerTM BLOTTO in TBS (Thermo Fisher Scientific), inkubovány přes noc při 4 °C s primárními protilátkami zředěnými v blokačním činidle obsahujícím 0,2% Tween®20, opláchnuty TBS s 0,1% Tween®20 a poté inkubovány 60 minut se sekundárními protilátkami (zředěnými opět v blokačním činidle s 0,2% Tween®20) při pokojové teplotě. Jako kontrolní protein byl detekován β -aktin (1:1 000, myší monoklonální protilátka, kat. č. A3853, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Dalšími použitými protilátkami byly anti-ER α (1:1 000, králičí polyklonální protilátka, 21244-1AP, Proteintech, Planegg-Martinsried, Německo), anti-CYP1B1 (1:5 000, králičí polyklonální protilátka, BSBTPB9546, Booster Bio, Pleasanton, CA, USA) a anti-CYP1A1 (1:125 – 1:250, 10 – 20 μ g/ml, králičí polyklonální protilátka (Soucek *et al.* 1995)). Sekundárními protilátkami byly IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit Secondary Antibody (1:5 000) and IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody (1:5 000) (Li-cor, Lincoln, NE, USA). Označené proteiny byly vizualizovány pomocí zobrazovacího systému Odyssey® Fc Imaging System (Li-cor) a kvantifikovány pomocí programu Image Studio verze 4.0.21 (Li-cor). Všechny analýzy byly provedeny ve třech nezávislých experimentech.

Pro analýzu proteinu v tkáních pacientek byly tyto tkáně podrceny pod tekutým dusíkem stejně jako v kapitole 3.2 a následně přeneseny do 300 μ l lyzačního pufru (50 mM Tris-HCl, pH=8,0, 150 mM NaCl, 10% Triton X100 (v/v)) doplněného o tablety s inhibitory proteáz a fosfatáz Roche cOmplete ULTRA tablets a PhosSTOP Roche (Sigma Aldrich). Vzorky v pufru

byly následně důkladně promíchány pomocí vortexu, 2 hodiny inkubovány při 4°C za neustálého promíchávání, centrifugovány ($14\,000 \times g$, 20 min, 4 °C) a uloženy při -20 °C. Koncentrace proteinu byla stanovena opět pomocí kitu PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Protokol pro analýzu proteinů z nádorových tkání vycházel sice ze stejného protokolu, jako v případě detekce proteinů ve vzorcích z buněčných linií, avšak pro zlepšení detekce studovaných proteinů byl v řadě kroků optimalizován. Pro analýzy bylo použito 10 – 40 µg celkového proteinu. Inkubace vzorků před samotnou elektroforézou probíhala za různých teplot (37 – 65 °C) a časů (10 – 60 minut) V případě proteinů o větší molekulové hmotnosti byl použit 6 – 7,5% polyakrylamidový gel. Rozdělené proteiny byly přeneseny jak na nitrocelulózu, tak na PVDF membránu. Testována byla také různá blokační činidla - BlockerTM BLOTTO in TBS (Thermo Fisher Scientific), 5% BSA (Sigma Aldrich), Odyssey Blocking Buffer (TBS) (Li-cor), Odyssey Blocking Buffer (PBS) (Li-cor), Casein Blocking Buffer (Li-cor). V závislosti na použitém blokačním činidle byly membrány promývány v TBS či PBS s 0,1% Tweenem. Jako primární protilátky byly použity: králičí polyklonální protilátka anti-ABCA2 (1:500 - 1:1 000, Proteintech, Rosemont, IL, USA), koží polyklonální protilátka anti-ABCA9 (1:1 600 – 1:2 000, Everest Biotech, Bicester, Spojené království), myší monoklonální protilátka anti-ABCG2 (1:100 – 1:500, Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), králičí polyklonální protilátka anti-ABCG2 (1:300 – 1:1 200, Proteintech), nebo králičí polyklonální protilátka anti-ABCG2 (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Jako sekundární protilátky byly využity jak příslušné fluorescenční protilátky (1:5 000 – 1:20 000, Li-cor), tak protilátky konjugované s křenuvou peroxidázou (1:10 000 – 1:20 000, Sigma Aldrich, nebo Amersham Biosciences).

3.15 Statistická analýza dat

V rámci první studie byl nejprve proveden Kolmogorov-Smirnovův test pro zjištění rozdělení dat. Protože expresní data nesplňovala podmínku normálního rozdělení pro parametrické testy, byly pro statistické hodnocení použity neparametrické testy. Rozdíly v expresi mezi ER pozitivními, ER negativními nádory a nemaligní tkání byly hodnoceny prostřednictvím programu REST 2009 (Qiagen, Hildesheim, Německo) a neparametrického Kruskal-Wallisova testu. V další fázi expresní studie byly potom klinicko-patologické údaje porovnány s genovou expresí opět pomocí Kruskal-Wallisova testu, Jonckheere-Terpstova testu a v případě spojitých veličin pomocí Spearmanova testu. Bezpříznakové přežívání (z angl. disease-free survival, DFS) bylo definováno jako doba, která uplynula mezi chirurgickým

odstraněním nádoru a progresí onemocnění nebo úmrtím z jakékoli příčiny. Hladiny genové exprese v nádorech byly rozděleny do skupin podle mediánu a k analýze byl použit Kaplan-Meierův graf přežití s Breslowovým testem. P-hodnoty menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Pro úpravu P-hodnot byla použita FDR korekce (z angl. false discovery rate) pro mnohočetné testování podle Benjaminiho a Hochberga (Benjamini and Hochberg 1995). Statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru SPSS v16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Ve druhé studii byl pro naměřené hladiny oxysterolů opět proveden test normality, tentokrát však pomocí Shapiro-Wilkova testu. Ani v tomto případě data nesplňovala požadavek normálního rozdělení. Z tohoto důvodu byly opět použity neparametrické testy – Kruskal-Wallisův a Spearmanův. Pro analýzu vlivu na bezpříznakové přežívání (DFS) byl využit Kaplan-Meierův graf přežití s Breslowovým testem. Protože v případě některých oxysterolů byly v naměřených datech odlehlé hodnoty, byly statistické analýzy provedeny nejprve na všech datech a následně na datech bez těchto odlehlých hodnot. P-hodnoty menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru SPSS v16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Ve studii zabývající se vlivem 7-KC *in vitro* byly hodnoty IC₅₀ pro TAM a 7-KC stanoveny pomocí softwaru GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Boston, MA, USA). Statistické srovnání hodnot IC₅₀, aktivity kaspáz, buněčné migrace a invaze a proteinové exprese mezi kontrolními buňkami a buňkami inkubovanými s testovanými látkami bylo provedeno Studentovým t-testem v programu MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). P-hodnoty menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

Při analýze qPCR dat byla exprese všech cílových genů (GOI) normalizována pomocí hladin tří housekeepingových genů (HKG) metodou ΔCt ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{GOI}} - \text{Ct}_{\text{HKG}}$). Pro statistickou analýzu byly použity hodnoty $-\Delta\Delta\text{Ct}$ ($-\Delta\text{Ct}_{\text{buňky s testovanou látkou}} - \Delta\text{Ct}_{\text{kontroly}}$) a Studentův t-test. Pro grafickou interpretaci byly počítány hodnoty tzv. fold change (FC) získané jako $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Deregulace genové exprese byla považována za statisticky významnou v případě že P-hodnota byla nižší než 0,05 a hodnota FC nižší než 0,67 (snížení genové exprese) nebo vyšší než 1,50 (zvýšení genové exprese). Pro úpravu P-hodnot byla použita FDR korekce mnohočetného testování podle Benjaminiho a Hochberga (Benjamini and Hochberg 1995).

Hladina proteinové exprese zjištěná pomocí western blottingu byla vyhodnocena pomocí denzitometrické analýzy v programu Image Studio 4.0.21 (Li-cor), kde byla rovněž provedena normalizace k hladině kontrolního proteinu. Výsledné hodnoty byly následně

porovnány Studentovým t-testem v programu MS Excel (Microsoft Corporation). P-hodnoty menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

4. Výsledky

4.1 Rozdíly v genové expresi u pacientek s karcinomem prsu (Kloudova *et al.* 2017)

4.1.1 Charakteristika patientské kohorty

V této studii byla genová exprese analyzována ve vzorcích pocházejících od 193 pacientek s karcinomem prsu. V první fázi studie byla nejprve exprese 70 genů testována na vzorcích 17 ER pozitivních (ER+), 12 ER negativních (ER-) karcinomů prsu a na 10 histologicky potvrzených vzorcích nemaligní tkáně. Výsledky exprese v těchto skupinách byly následně porovnány ve snaze získat geny s ER-dependentní regulací genové exprese. Na základě tohoto porovnání (zejména ER pozitivních a ER negativních vzorků) byly vybrány geny pro druhou část analýzy, která proběhla na setu 164 vzorků pacientek s ER pozitivním karcinomem prsu. Jejich klinicko-patologická data, která byla následně porovnána s výsledky genové exprese, jsou v Tabulce 7.

Tabulka 7. Charakteristika ER pozitivních patientek zařazených do druhé části studie.

Klinicko-patologická data		N = 164
Věk v době diagnózy (průměr ± SD)		64 ± 11
Menopauza	Premenopauzální	17 (10 %)
	Postmenopauzální	145 (88 %)
	Neznámo	2 (1 %)
Histologický typ nádoru	Invazivní duktální karcinom	138 (84 %)
	Jiný typ*	23 (14 %)
	Neznámo	3 (2 %)
Stádium (Disease stage)	I	87 (53 %)
	II	59 (36 %)
	III	16 (10 %)
	IV	2 (1 %)
Postižení lymfatických uzlin	Přítomno (pN1-3)	54 (33 %)
	Nepřítomno (pN0)	108 (66 %)
	Neznámo	2 (1 %)
Histologický grade	1	45 (27 %)
	2	98 (60 %)
	3	16 (10 %)
	Neznámo	5 (3 %)
Expres ER	Pozitivní (> 1%)	164 (100 %)
	Negativní	0 (0 %)
Expres PR	Pozitivní (> 1%)	134 (82 %)
	Negativní	30 (18 %)
Expres HER2 (ERBB2)	Pozitivní (IHC 2+/3+ potvrzeno FISH)	28 (17 %)
	Negativní	136 (83 %)
Expres Ki67	Vysoká (≥ 14 %)	14 (8 %)
	Nízká (< 14%)	36 (22 %)
	Neznámo	114 (70 %)
Subtyp	Luminal A	34 (21 %)
	Luminal B	16 (10 %)
	Neznámo	114 (69 %)
Terapie	Pouze tamoxifen (TAM)	42 (26 %)
	Pouze inhibitory aromatázy (AI)	33 (20 %)
	Kombinace TAM a AI	20 (12 %)
	Hormonální terapie (nespecifikováno)	1 (1 %)
	TAM nebo AI a chemoterapie	44 (27 %)
	Pouze chemoterapie	4 (2 %)
	Neznámo	20 (12 %)

* Jinými typy karcinomu prsu byly invazivní lobulární karcinom (n=18), mucinózní (n=2), duktální karcinom *in situ* (n=1), papilární (n=1) a smíšený typ (n=1). SD = směrodatná odchylka

4.1.2 Rozdíly v genové expresi mezi ER pozitivními a ER negativními karcinomy prsu

V první fázi studie byla stanovena exprese 70 genů u vzorků 17 ER pozitivních, 12 ER negativních karcinomu prsu a u 10 histologicky potvrzených nenádorových tkání. Na základě porovnání exprese mezi ER pozitivními a ER negativními tumory byla zjištěna rozdílná hladina exprese u 23 genů oxysterolové dráhy (*ACAT2*, *ATF6*, *HMGCS1*, *HMGCS2*, *OXCT1* a *SREBF1*), metabolismu oxysterolů (*CYP7B1*, *CYP24A1*, *CYP39A1*, *CYP51A1*, *DHCR7*, *EBP* a *CH25H*), transkripčních faktorů a koaktivátorů (*ESR1*, *PPARGC1A*, *RXRA* a *RXRG*) a transportérů (*ABCA2*, *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCC1*, *ABCG1* a *ABCG2*). Tyto geny byly vybrány pro druhou část studie.

Výsledky porovnání exprese v ER pozitivních tumorech s expresí v ER negativních tumorech a také v nemaligní kontrolní tkáni jsou shrnuty v Tabulce 8. Porovnání genové exprese ukázalo například významně vyšší expresi *ESR1* v ER pozitivních tumorech a naopak snížení této exprese v ER negativních tumorech (ER+ > kontrolní tkáň > ER-). Exprese genu *ABCG1* byla významně zvýšená u obou typů nádorů v porovnání s kontrolní tkáni (ER+ < ER- < kontrolní tkáň) a naopak exprese genů *CYP39A1*, *OXCT1* a *PPARGC1A* byla v nádorových tkáních významně snížena (kontrolní tkáň > ER- > ER+). Podobně tomu bylo v případě exprese genů *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCG2*, *CH25H* a *RXRG* (kontrolní tkáň > ER+ > ER-).

Tabulka 8: Statisticky významné rozdíly v hladinách exprese studovaných genů mezi ER pozitivními tumory (ER+), ER negativními tumory (ER-) a nemaligními kontrolami (CTRL).

Šipky znázorňují zvýšenou (↑) nebo sníženou (↓) expresi v ER+ v porovnání s ER- nádory, respektive kontrolami. Hladiny exprese byly porovnány pomocí Kruskal-Wallisova testu (P-hodnoty), pro úpravu P-hodnot byla následně použita FDR korekce (P_{adj}-hodnoty). NS = nesignifikantní výsledek.

Gen	ER+ vs ER-	Fold change	P-hodnota	P _{adj}	ER+ vs CTRL	Fold change	P-hodnota	P _{adj}
Oxysterolová dráha								
<i>ACAT2</i>	↓	0,32	0,001	0,004	-	-	NS	NS
<i>ATF6</i>	↓	0,54	0,016	0,021	-	-	NS	NS
<i>HMGCS1</i>	↓	0,47	0,010	0,014	-	-	NS	NS
<i>HMGCS2</i>	↑	240,86	< 0,001	0,004	-	-	NS	NS
<i>OXCT1</i>	↓	0,31	< 0,001	0,004	↓	0,52	0,003	0,012
<i>SREBF1</i>	↑	2,18	0,003	0,007	-	-	NS	NS
Metabolismus oxysterolů								
<i>CYP7B1</i>	↓	0,45	0,009	0,014	-	-	NS	NS
<i>CYP24A1</i>	↓	0,05	0,004	0,008	-	-	NS	NS
<i>CYP39A1</i>	↓	0,11	< 0,001	0,004	↓	0,32	0,004	0,012
<i>CYP51A1</i>	↓	0,55	0,024	0,029	-	-	NS	NS
<i>DHCR7</i>	↓	0,23	0,003	0,007	-	-	NS	NS
<i>EBP</i>	↓	0,36	0,001	0,004	-	-	NS	NS
<i>CH25H</i>	↑	1,54	0,034	0,035	↓	0,49	0,009	0,022
Transkripční faktory a koaktivátory								
<i>ESR1</i>	↑	149,59	< 0,001	0,004	↑	5,34	0,001	0,006
<i>PPARGC1A</i>	↓	0,17	0,006	0,011	↓	0,22	< 0,001	0,006
<i>RXRA</i>	↑	1,48	0,017	0,021	-	-	NS	NS
<i>RXRG</i>	↑	1,65	0,034	0,035	↓	0,34	0,009	0,022
ABC transportéry								
<i>ABCA2</i>	↑	1,78	0,003	0,007	-	-	NS	NS
<i>ABCA9</i>	↑	2,86	0,003	0,007	↓	0,26	0,001	0,006
<i>ABCA10</i>	↑	4,04	0,001	0,004	↓	0,18	< 0,001	0,006
<i>ABCC1</i>	↓	0,47	0,005	0,010	-	-	NS	NS
<i>ABCG1</i>	↑	1,49	0,033	0,035	↑	2,10	0,004	0,012
<i>ABCG2</i>	↑	1,53	0,046	0,050	↓	0,57	0,016	0,035

4.1.3 Vztahy genové exprese ke klinicko-patologickým údajům pacientek

Ve druhé části studie byla stanovena genová exprese u 164 ER pozitivních tumorů, která byla následně porovnána s klinicko-patologickými daty pacientek. Expresce byla stanovena u 23 genů, jejichž hladina se významně lišila mezi ER pozitivními a negativními tumory z první části studie. K těmto genům byl navíc přidán gen *ESR2*. Testovanými proměnnými byly věk v době diagnózy, menopauzální status (premenopauzální vs. postmenopauzální), TNM stadium (SI vs. SII nebo SIII), histologický grade (G1 vs. G2 nebo G3), exprese progesteronového receptoru (pozitivní vs. negativní), exprese HER2 (pozitivní vs. negativní) a lumenální subtyp (A vs B).

S věkem v době diagnózy pozitivně korelovala exprese genů *ESR1* ($P < 0,001$, $\rho = 0,379$) a *HMGCS2* ($P = 0,007$, $\rho = 0,208$). Negativní korelace byla naopak zjištěna v případě exprese genů *ABCA9* ($P = 0,012$, $\rho = -0,195$), *ABCA10* ($P = 0,021$; $\rho = -0,180$), *CYP24A1* ($P = 0,015$, $\rho = -0,190$) a *CH25H* ($P = 0,045$, $\rho = -0,156$). Vysoká hladina exprese *ESR1* ($P < 0,001$) a *ABCG1* ($P = 0,030$) byla potom spojena s postmenopauzálním stavem pacientek. Statisticky významné asociace se stádiem nádoru, histologickým grade, stavem exprese receptorů pro progesteron a HER2 a se subtypem nádorů jsou shrnuty v Tabulce 9.

Analýza trendu zjištěných vztahů pomocí Jonckheere-Terpstrova testu potvrdila asociaci genů *ATF6*, *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCG2*, *CH25H*, *CYP24A1*, *CYP39A1* a *PPARGC1A* s histopatologickým grade, kdy hladina exprese těchto genů klesá se zvyšujícím se grade ($G1 > G2 > G3$). Podobně, hladina exprese genů *ABCG2*, *CH25H*, *CYP7B1*, *CYP24A1*, *CYP39A1* a *PPARGC1A* klesá se zvyšujícím se stádiem nádoru ($SI > SII > SIII$), viz Obrázky 8 a 9.

Tabulka 9 (1. část): Vztahy genové exprese ke klinicko-patologickým údajům pacientek

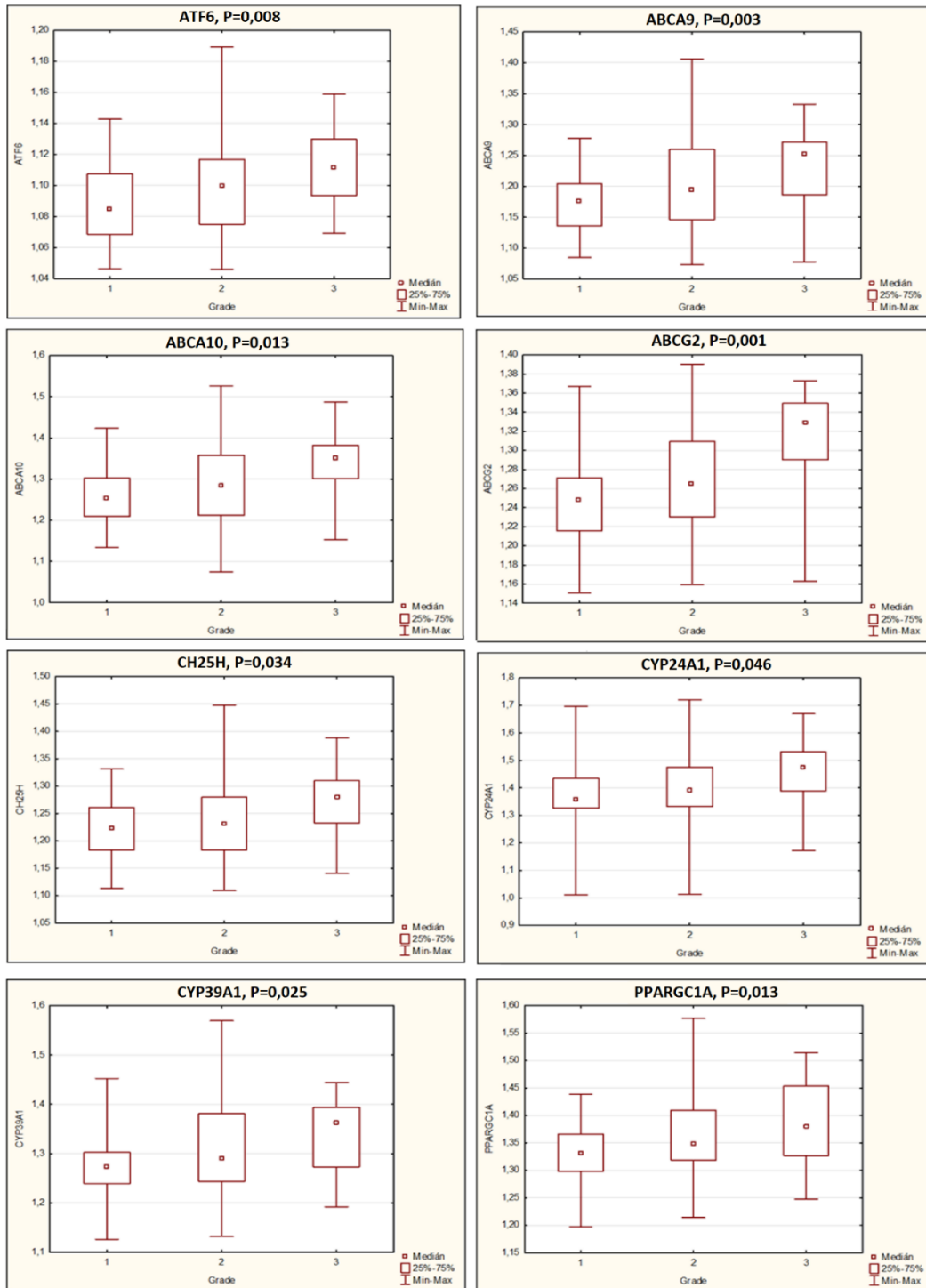
Výsledky genové exprese jsou prezentovány jako normalizované hodnoty (aritmetický průměr ± směrodatná odchylka). P-hodnoty byly stanoveny pomocí Kruskal-Wallisova testu a pro jejich úpravu byla následně uplatněna FDR korekce (adjustované P-hodnoty jsou znázorněny jako P_{adj}). Vzhledem k výpočtu normalizace ($Ct(\text{cílový gen})/Ct(\text{referenční gen})$) znamená vyšší hodnota normalizované genové exprese ve skutečnosti nižší expresi daného genu (čím vyšší Ct tím nižší počet kopií a tedy exprese transkriptu genu). NS = nesignifikantní výsledek.

Gen	Stádium onemocnění		Histologický grade		Exprese PR		Exprese HER2 (ERBB2)		Subtyp	
	SI	SII a SIII	G1	G2 a G3	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Luminal A	Luminal B
Počet pacientek	87	75	45	114	30	134	136	28	34	16
Oxysterolová dráha										
<i>OXCT1</i>	NS		NS		1,18 ± 0,04 P=0,043	1,17 ± 0,04 P _{adj} =0,475	NS		NS	
<i>ATF6</i>	NS		1,09 ± 0,02 P=0,014	1,10 ± 0,03 P _{adj} =0,084	NS		NS		NS	
Metabolismus oxysterolů										
<i>CH25H</i>	1,22 ± 0,06 P=2,27 × 10 ⁻⁶	1,26 ± 0,07 P _{adj} =5,67 × 10 ⁻⁵	NS		NS		1,23 ± 0,06 P=0,008	1,27 ± 0,08 P _{adj} =0,075	NS	
<i>CYP7B1</i>	1,13 ± 0,04 P=0,013	1,14 ± 0,04 P _{adj} =0,046	NS		NS		NS		NS	
<i>CYP24A1</i>	1,38 ± 0,11 P=0,015	1,42 ± 0,13 P _{adj} =0,046	NS		NS		NS		NS	
<i>CYP39A1</i>	1,29 ± 0,09 P=0,005	1,32 ± 0,08 P _{adj} =0,021	1,27 ± 0,07 P=0,017	1,31 ± 0,07 P _{adj} =0,084	NS		1,30 ± 0,08 P=0,40	1,33 ± 0,10 P _{adj} =0,133	NS	
<i>DHCR7</i>	NS		NS		NS		NS		1,09 ± 0,03 P=0,015	1,06 ± 0,03 P _{adj} =0,125
<i>EBP</i>	NS		NS		NS		1,14 ± 0,03 P=0,045	1,15 ± 0,03 P _{adj} =0,133	1,12 ± 0,02 P=0,006	1,10 ± 0,02 P _{adj} =0,076

Tabulka 9 (2. část): Vztahy genové exprese ke klinicko-patologickým údajům pacientek

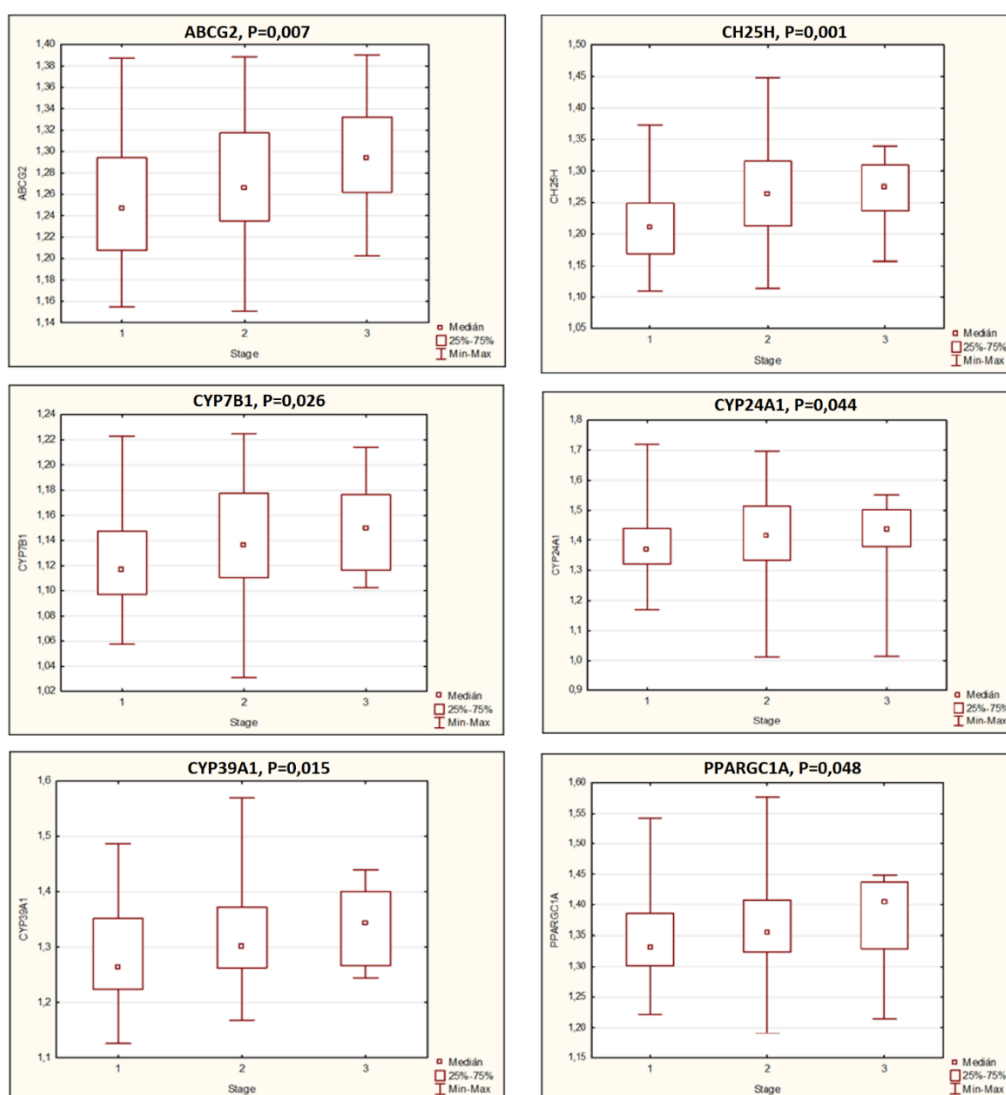
Výsledky genové exprese jsou prezentovány jako normalizované hodnoty (aritmetický průměr ± směrodatná odchylka). P-hodnoty byly stanoveny pomocí Kruskal-Wallisova testu a pro jejich úpravu byla následně uplatněna FDR korekce (adjustované P-hodnoty jsou znázorněny jako P_{adj}). Vzhledem k výpočtu normalizace (Ct(cílový gen)/Ct(referenční gen)) znamená vyšší hodnota normalizované genové exprese ve skutečnosti nižší expresi daného genu (čím vyšší Ct tím nižší počet kopií a tedy exprese transkriptu genu). NS = nesignifikantní výsledek.

Gen	Stádium (tumour stage)		Histologický grade		Expres PR		Expres HER2 (ERBB2)		Subtyp	
	SI	SII a SIII	G1	G2 a G3	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Luminal A	Luminal B
Počet pacientek	87	75	45	114	30	134	136	28	34	16
Transkripční faktory a koaktivátory										
<i>ESR2</i>	1,36 ± 0,06	1,40 ± 0,07	NS		NS		NS		NS	
	P=2,88 × 10 ⁻⁴	P _{adj} =0,002								
<i>PPARGC1A</i>	1,35 ± 0,07	1,36 ± 0,07	1,33 ± 0,05	1,36 ± 0,07	NS		NS		1,30 ± 0,05	1,33 ± 0,04
	P=0,021	P _{adj} =0,058	P=0,009	P _{adj} =0,084					P=0,022	P _{adj} =0,135
<i>RXRA</i>	1,07 ± 0,03	1,08 ± 0,04	1,07 ± 0,04	1,08 ± 0,04	NS		1,07 ± 0,03	1,09 ± 0,04	NS	
	P=0,045	P _{adj} =0,111	P=0,034	P _{adj} =0,140			P=0,015	P _{adj} =0,075		
<i>RXRG</i>	NS		NS		1,42 ± 0,07	1,39 ± 0,07	1,39 ± 0,07	1,43 ± 0,09	NS	
					P=0,032	P _{adj} =0,475	P=0,018	P _{adj} =0,075		
ABC transportéry										
<i>ABCA2</i>	NS		NS		NS		1,13 ± 0,03	1,14 ± 0,04	NS	
							P=0,016	P _{adj} =0,075		
<i>ABCA9</i>	1,18 ± 0,06	1,23 ± 0,07	1,17 ± 0,05	1,21 ± 0,07	NS		1,19 ± 0,08	1,24 ± 0,08	NS	
	P=1,02 × 10 ⁻⁵	P _{adj} =1,27 × 10 ⁻⁴	P=0,004	P _{adj} =0,084			P=0,004	P _{adj} =0,075		
<i>ABCA10</i>	1,26 ± 0,08	1,32 ± 0,09	1,26 ± 0,07	1,30 ± 0,10	NS		1,28 ± 0,09	1,34 ± 0,10	NS	
	P=3,09 × 10 ⁻⁵	P _{adj} =2,57 × 10 ⁻⁴	P=0,043	P _{adj} =0,155			P=0,009	P _{adj} =0,075		
<i>ABCG2</i>	1,25 ± 0,06	1,28 ± 0,05	1,25 ± 0,05	1,27 ± 0,06	NS		1,26 ± 0,06	1,29 ± 0,06	1,21 ± 0,04	1,25 ± 0,05
	p=0,004	P _{adj} =0,020	P=0,10	P _{adj} =0,084			P=0,048	P _{adj} =0,133	P=0,005	P _{adj} =0,076



Obrázek 8: Krabicové grafy ukazující hladiny exprese studovaných genů rozdělených podle histologického grade

Analýza trendu mezi více než dvěma kategoriemi pomocí Jonckheere-Terpstova testu u těchto genů potvrdila signifikantní trend snižující se genové exprese se zvyšujícím se histologickým grade. Vzhledem k normalizaci vůči expresi referenčních genů jako Ct(cílový gen)/Ct(referenční gen) znamená vyšší hodnota normalizované genové exprese ve skutečnosti nižší exprese daného genu (čím vyšší Ct tím nižší počet kopií a tedy exprese transkriptu genu).

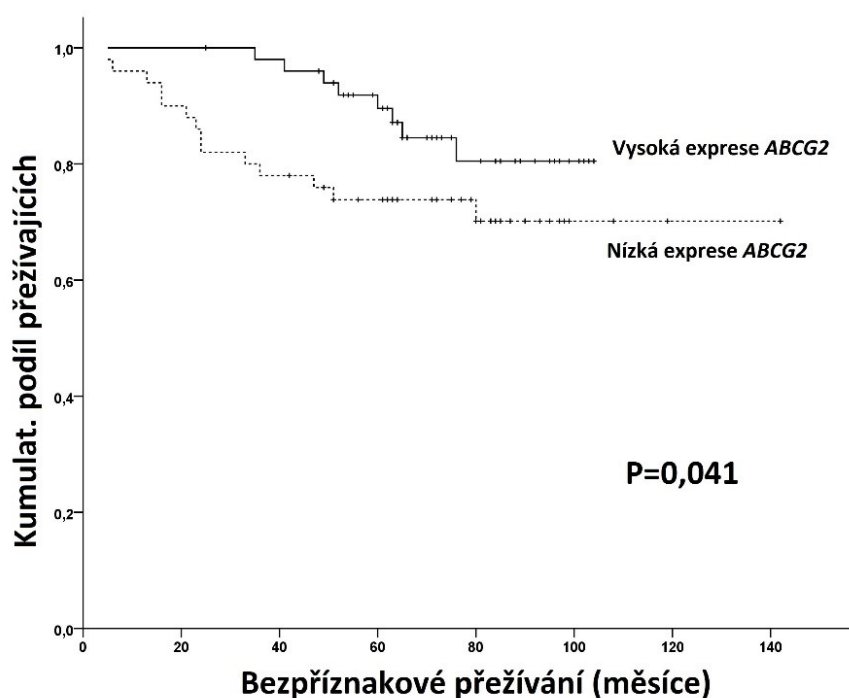


Obrázek 9: Krabicové grafy ukazující hladiny exprese studovaných genů rozdělených podle TNM stádia onemocnění

Analýza pomocí Jonckheere-Terpstova testu u těchto genů potvrdila signifikantní trend snižující se genové exprese se zvyšujícím se stádiem nádoru. Vzhledem k normalizaci vůči expresi referenčních genů jako Ct(cílový gen)/Ct(referenční gen) znamená vyšší hodnota normalizované genové exprese ve skutečnosti nižší exprese daného genu (čím vyšší Ct tím nižší počet kopií a tedy exprese transkriptu genu).

Pro všechny studované geny byla provedena také analýza vztahu exprese k celkovému bezpříznakovému přežívání pacientek. V analýze na souboru všech pacientek bez ohledu na terapii byla zjištěna významná asociace exprese genu *ABCG2* k bezpříznakovému přežívání, kdy pacientky s vyšší hladinou *ABCG2* vykazovaly delší bezpříznakové přežívání, než pacientky s expresí nižší než medián ($P=0,041$, Obrázek 10). V případě dalších genů zahrnutých do studie nebyl zjištěn žádný statisticky významný vztah s bezpříznakovým

přežíváním. Analýza bezpříznakového přežívání vztažená pouze na skupinu pacientek léčených hormonální terapií (tamoxifen a/nebo inhibitory aromatázy) asociaci s expresí genu *ABCG2* neprokázala a nebyla ani zjištěna asociace žádného jiného studovaného genu.

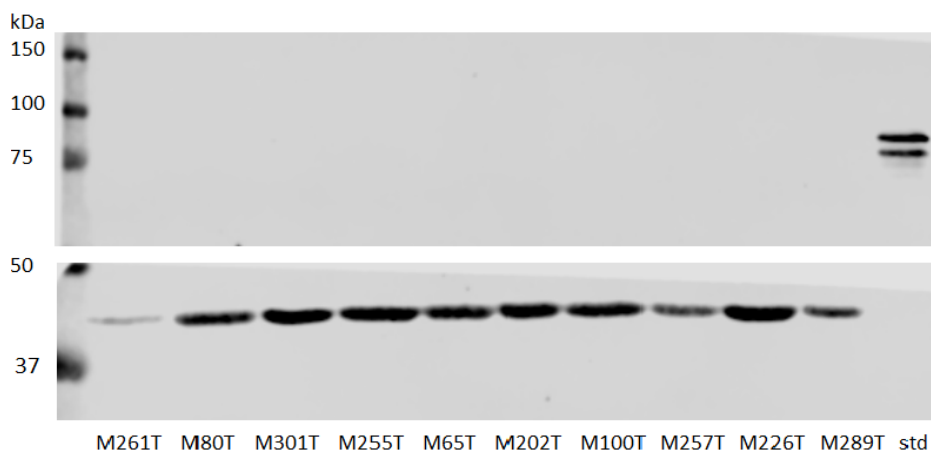


Obrázek 10: Vztah hladiny exprese genu *ABCG2* s bezpříznakovým přežíváním pacientek

Kaplan-Meierův graf znázorňující hladiny exprese genu *ABCG2* rozdělené podle mediánu, kdy pacientky s vyšší expresí (N=51, plná čára) vykazovaly delší bezpříznakové přežívání, než pacientky se sníženou expresí tohoto genu (N=50, přerušovaná čára).

4.1.4 Detekce změn na úrovni proteinu v tkáních pacientek

Pro ověření výsledků genové exprese také na úrovni proteinu byla provedena řada experimentů ve snaze detekovat vybrané proteiny pomocí metody western blotting. Pro tuto detekci byly vybrány tři proteiny ze skupiny ABC transportérů, ABCA2, ABCA9 a ABCG2. Navzdory intenzivní snaze o detekci a řadě pokusů zahrnujících mnoho optimalizací protokolu a úprav metodiky, jako je inkubace vzorku před samotnou elektroforézou (SDS-PAGE) při různých teplotách a různě dlouhých časech inkubace, zkouška několika primárních protilátek od různých výrobců, či testování řady různých blokačních činidel, se však nepodařilo tyto proteiny úspěšně detekovat. Hlavním důvodem je pravděpodobně fakt, že se jedná o transmembránové proteiny a navíc ve dvou případech s velkou molekulovou hmotností (ABCA2 – 270 kDa, ABCA9 – 184 kDa). Nicméně ani třetí, menší a častěji studovaný transportér (ABCG2 – 72 kDa) se detekovat nepodařilo (Obrázek 11).



Obrázek 11: Výsledek detekce proteinu ABCG2 v tkáních pacientek s karcinomem prsu
 Vrchní část ukazuje absenci proteinu ABCG2 v nádorech lidského karcinomu prsu (vzorky s kódem MxxxT), za současné detekce standardu ABCG2 (Abnova). Spodní část ukazuje výsledek detekce β -aktinu na stejné membráně, který byl použit jako kontrolní protein pro ověření kvality vzorku, nanášky vzorku na gel i provedení samotné metodiky.

4.2 Rozdíly hladiny oxysterolů v cirkulaci u pacientek s karcinomem prsu

(Kloudova-Spalenkova *et al.* 2020)

4.2.1 Charakteristika patientské kohorty

Ve studii, která měla za cíl stanovit hladinu oxysterolů v plasmě pacientek s karcinomem prsu, byly zahrnuty vzorky od celkem 58 pacientek s ER pozitivním karcinomem prsu (subtyp luminal A nebo B). Jejich charakteristika a klinicko-patologické údaje jsou shrnuty v Tabulce 10.

Tabulka 10. Charakteristika ER pozitivních pacientek zařazených do druhé části studie.

Klinicko-patologická data		N = 58
Věk v době diagnózy (průměr)		62 ± 12
Menopauza	Premenopauzální	14 (24 %)
	Postmenopauzální	44 (76 %)
Histologický typ nádoru	Invazivní duktální karcinom	47 (83 %)
	Jiný typ*	10 (17 %)
Stádium (Disease stage)	IA	43 (74 %)
	IB	1 (2 %)
	IIA	9 (16 %)
	IIB	1 (2 %)
	Neznámo	4 (7 %)
Postižení lymfatických uzlin (pN)	pN0	47 (81 %)
	pN1	6 (10 %)
	pN2	1 (2 %)
	Neznámo	4 (7 %)
Velikost nádoru	pT1	42 (72 %)
	pT2-4	16 (28 %)
Histologický grade	1	16 (28 %)
	2	39 (67 %)
	3	3 (5 %)
Exprese ER	Pozitivní (>1%)	58 (100 %)
	Negativní	0 (0 %)
Exprese PR	Pozitivní (>1%)	49 (84 %)
	Negativní	9 (16%)
Exprese Ki67 / Subtyp [#]	Vysoká (≥14 %) /Luminal B	4 (7 %)
	Nízká (< 14 %) /Luminal A	12 (21 %)
	Neznámo	42 (72 %)
Exprese HER2 (ERBB2)	Pozitivní (IHC 2+/3+ potvrzeno FISH)	0 (0%)
	Negativní	58 (100 %)
Terapie	Pouze tamoxifen (TAM)	34 (59 %)
	Kombinace TAM a AI	24 (41 %)

* Jinými typy karcinomu prsu byly invazivní lobulární karcinom (n=8), mucinózní (n=1), a tubulární (n=1) karcinom. SD = směrodatná odchylka

[#] Vzhledem k tomu, že všechny nádory zahrnuté do této studie byly HER2-negativní, odpovídá vysoká/nízká exprese markeru Ki67 také molekulárnímu subtypu příslušného nádoru. Vzhledem ke stáří vzorků jsou údaje o Ki67/subtypu neúplné.

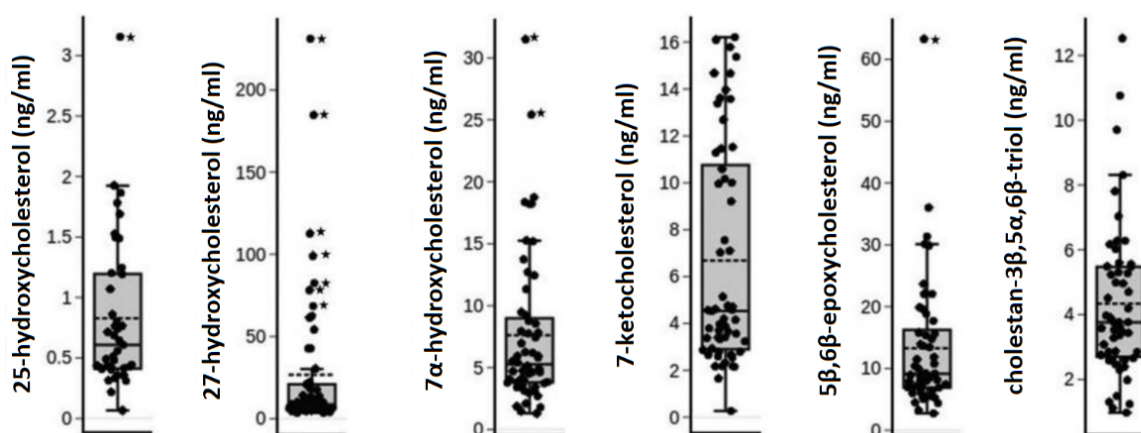
4.2.2 Detekované hladiny oxysterolů

Tabulka 11 znázorňuje naměřené hladiny všech oxysterolů. V případě 6 oxysterolů se hladinu podařilo stanovit u většiny z analyzovaných vzorků. Nejvíce chybějících hodnot (pod limitem detekce) bylo v případě 25-HC (N=17), jehož hladiny byly obecně ze všech analyzovaných oxysterolů nejnižší (0,07 – 3,16 ng/ml plasmy). Poslední z testovaných oxysterolů, α -EC, se však nepovedlo detekovat ani u jednoho vzorku z 58 testovaných a proto byl z následných analýz vztahů s klinicko-patologickými daty vyřazen.

Tabulka 11: Hladiny oxysterolů s plasmě pacientek s karcinomem prsu

Oxysterol	Průměr \pm směrodatná odchylka (ng/ml)	Rozsah	Chybějící hodnoty (počet)
25-hydroxycholesterol	0,83 \pm 0,62	0,07 – 3,16	17
27-hydroxycholesterol	26,7 \pm 43,1	3,48 – 231	0
7 α -hydroxycholesterol	7,62 \pm 6,15	1,31 – 31,5	2
7-ketocholesterol	6,68 \pm 4,74	0,27 – 16,2	1
5 α ,6 α -epoxycholesterol	nedetekován	nedetekován	58
5 β ,6 β -epoxycholesterol	15,8 \pm 21,4	2,74 – 63,3	5
cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol	4,34 \pm 2,38	0,98 – 12,5	6

Obrázek 12 zobrazuje krabicové grafy s hladinami 6 oxysterolů, jejichž hladina byla stanovena u většiny vzorků. V případě 27-HC, 7 α -HC a β -EC byla zjištěna významná variabilita v hladině mezi jednotlivými pacientkami s několika odlehlými hodnotami.



Obrázek 12: Distribuce hladin jednotlivých oxysterolů v plasmě pacientek

Medián je zobrazen plnou čarou a přerušovaná čára značí aritmetický průměr. Odlehlé hodnoty jsou znázorněny hvězdičkou.

4.2.3 Porovnání s klinicko-patologickými daty

Analýza korelace hladiny jednotlivých oxysterolů ukázala významnou korelaci 25-HC a 7-KC. Hladina 27-HC významně korelovala s hladinou 7 α -HC, β -EC a také CT, hladina 7 α -HC potom korelovala s β -EC a CT. Negativní korelace byla potom zjištěna pro hladiny 7-KC a β -EC. Vzhledem k odlehlým hodnotám zjištěným zejména u 27-HC, 7 α -HC a β -EC byla analýza provedena jak pro všechny hodnoty, tak pro hladiny oxysterolů bez odlehlých hodnot. Analýza bez těchto hodnot potvrdila všechny signifikantní korelace s výjimkou 7-KC a 25-HC (Tabulka 12).

Tabulka 12: Korelace hladin jednotlivých oxysterolů v plasmě pacientek

Výsledky, jejichž významnost se potvrdila i v analýze bez odlehlých hodnot jsou podbarveny šedivě.

Oxysterol		27-HC	7 α -HC	7-KC	β -EC	CT
25-HC	Korelační koeficient	- 0,073	0,192	0,512	- 0,128	0,111
	P-hodnota	0,649	0,241	0,001	0,438	0,511
27-HC	Korelační koeficient		0,743	- 0,409	0,609	0,505
	P-hodnota		<0,001	0,002	<0,001	<0,001
7 α -HC	Korelační koeficient			- 0,053	0,573	0,414
	P-hodnota				<0,001	0,003
7-KC	Korelační koeficient				- 0,275	0,066
	P-hodnota				0,046	0,646
β -EC	Korelační koeficient					0,215
	P-hodnota					0,0137

Porovnání hladiny oxysterolů s klinicko-patologickými daty pacientek ukázalo významně nižší hladinu 27-HC a 7 α -HC u pacientek s menšími nádory (pT1) ve srovnání s pacientkami s většími nádory (pT2-4). Tato korelace se potvrdila také při analýze dat bez odlehlých hodnot. Hladina β -EC signifikantně korelovala s velikostí nádoru pouze při analýze bez odlehlých hodnot. Hladina 27-HC, 7 α -HC, β -EC a CT byla významně nižší u pacientek v časném stadiu (SIA) ve srovnání s pokročilejšími stadii onemocnění (SIB a SIIA/B). Analýza dat bez odlehlých hodnot tuto korelaci potvrdila u β -EC, ale ne v případě 27-HC a 7 α -HC. Hladina CT byla potom statisticky významně vyšší u nádorů subtypu luminal B s vyšší expresí markeru Ki67 ($\geq 14\%$), avšak počet vzorků porovnávaných v této analýze byl nízký (4 vs. 12 vzorků). Analýza korelace s věkem pacientek ukázala významnou pozitivní korelaci pro všechny oxysteroly kromě 25-HC, tato korelace se potom potvrdila na hodnocení bez odlehlých dat pro 7 α -HC a β -EC, ale ne pro 27-HC. Souvislost mezi hladinou 27-HC a menopauzálním stavem byla významná pouze pro hodnocení celého setu vzorků, ale ne při hodnocení dat bez

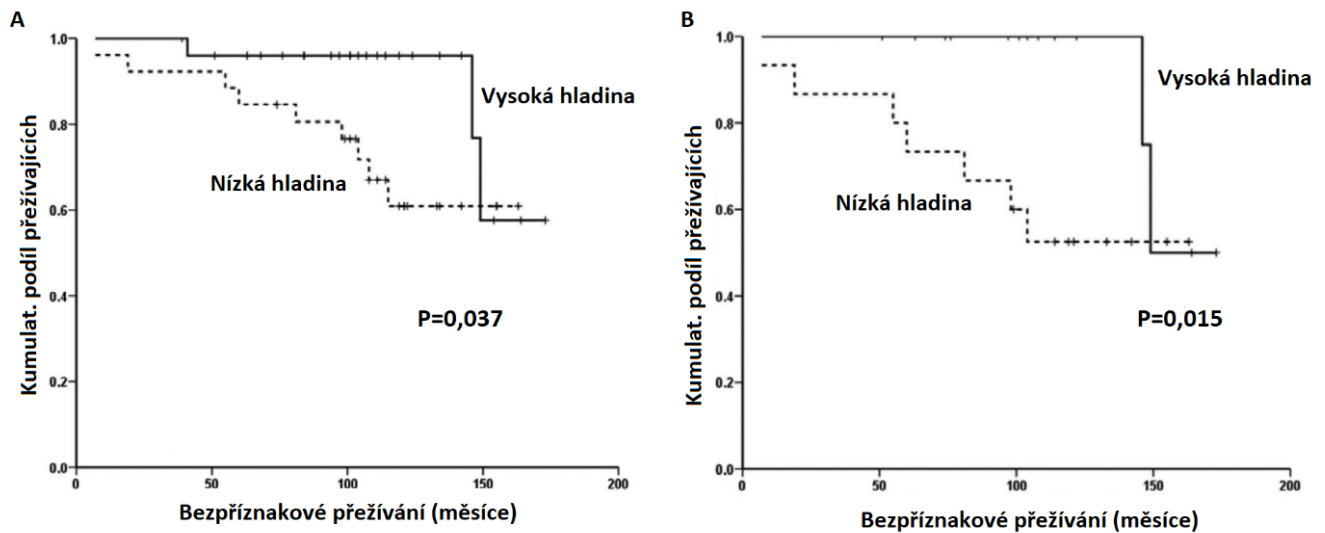
odlehých hodnot. Při porovnání hladiny oxysterolů s histologickým typem nádoru, histologickým grade, přítomností metastáz v lymfatických uzlinách (pN) a exprese progesteronového receptoru nebyly výsledky signifikantní (Tabulka 13).

Tabulka 13: Porovnání hladiny oxysterolů s klinicko-patologickými daty pacientek

P-hodnoty byly získány za základě Spearmanova korelačního nebo Kruskal-Wallisova testu. V případě 27-HC, 7 α -HC a β -EC byly analýzy provedeny také pro soubor dat bez odlehých hodnot. Potvrzené vztahy jsou podbarveny šedivě.

Klinicko-patologické údaje		25-HC	27-HC	7 α -HC	7-KC	β -EC	CT
Věk v době diagnózy	P-hodnota	0,589	0,007	0,002	0,011	0,027	0,032
	Korelační koeficient	-0,087	0,348	0,405	0,938	0,301	0,298
	Bez odlehých hodnot	-	0,112	0,006	-	0,026	-
	Korelační koeficient	-	0,225	0,370	-	0,308	-
Menopauzální status (pre vs. postmenopauzální)	P-hodnota	0,866	0,044	0,068	0,778	0,053	0,143
	Bez odlehých hodnot	-	0,181	0,102	-	0,079	-
Histologický typ nádoru (duktální vs. jiný typ)	P-hodnota	0,822	0,450	0,181	0,578	0,733	0,722
Histologický grade (G1 vs. G2 nebo G3)	P-hodnota	0,933	0,321	0,219	0,873	0,199	0,479
Velikost nádoru (pT1 vs. pT2-4)	P-hodnota	0,376	0,011	0,007	0,077	0,072	0,089
	Bez odlehých hodnot	-	0,017	0,003	-	0,038	-
Expresse Ki67	P-hodnota	0,405	0,089	0,365	0,225	0,308	0,043
Postižení lymfatických uzlin (pN01 vs. pN1)	P-hodnota	0,790	0,202	0,528	0,581	0,108	0,152
Stádium onemocnění (SIA vs. SIB nebo SII)	P-hodnota	0,580	0,007	0,035	0,392	0,015	0,018
	Bez odlehých hodnot	-	0,143	0,182	-	0,022	-
Expresse progesteronového receptoru (pozitivní vs. negativní)	P-hodnota	0,531	0,957	0,907	0,526	0,917	0,214

Analýza bezpříznakového přežívání ukázala, že pacientky s hladinou CT nad medián měly významně kratší dobu bezpříznakového přežívání. Tato analýza byla provedena jak na celém souboru pacientek (P=0,037), tak také na souboru pacientek léčených pouze tamoxifenem (N=34, P=0,015) (Obrázek 13). Hladiny oxysterolů mezi skupinou pacientek léčených pouze tamoxifenem a skupinou léčených tamoxifenem a inhibitory aromatázy se přitom významně nelišily. Hladiny ostatních oxysterolů s bezpříznakovým přežíváním významně nesouvisely.

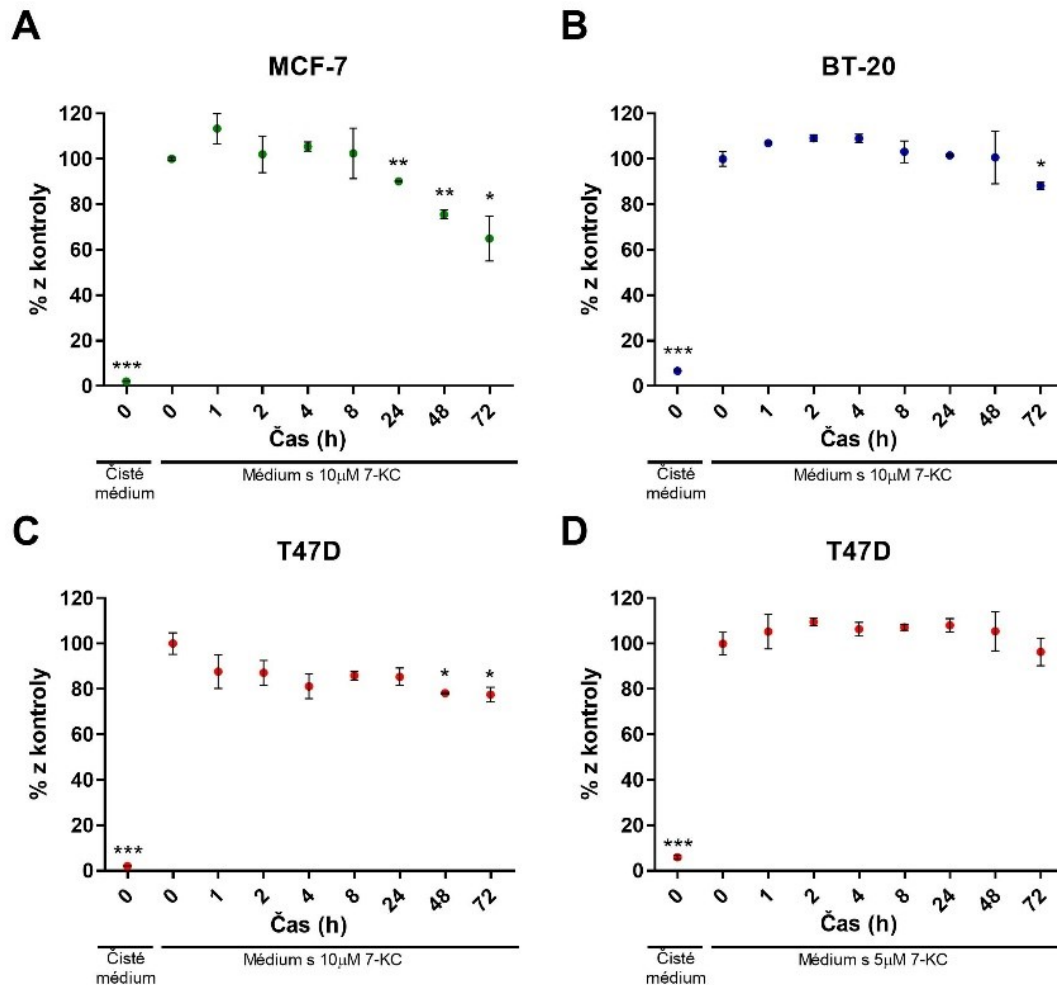


Obrázek 13: Vztah hladin CT a bezpříznakového přežívání pacientek
 (A) Hladina CT v celém souboru pacientek zahrnutých do studie. (B) Hladina CT u pacientek léčených pouze tamoxifenem.

4.3 *In vitro* studie vlivu 7-ketocholesterolu na účinnost tamoxifenu (Spalenkova *et al.*, nepublikovaná data – přijato k publikaci)

4.3.1. Stabilita 7-ketocholesterolu v kultivačním médiu

Pro ověření stability 7-KC v médiu za kultivačních podmínek (37°C, 5% CO₂) byla analyzována hladina 7-KC ve vzorcích média s přidaným 7-KC, které bylo odebráno v časech 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48 a 72 hodin od přidání 10 μM 7-KC ke všem buněčným liniím (MCF-7, T47D a BT-20). V případě buněčné linie T47D byla analyzována také poloviční, 5 μM koncentrace, která odpovídala hladině 7-KC použité u všech dalších experimentů na této linii. Díky této analýze bylo zjištěno, že stabilita 7-KC v médiu se liší v závislosti na testované koncentraci a buněčné linii. Nejvyšší stabilita byla pozorována v případě buněčné linie T47D kultivované v přítomnosti 5 μM 7-KC (Obrázek 14D) a u linie BT-20 s 10 μM 7-KC (Obrázek 14B), kde i po 48 hodinách byla hladina 7-KC stejná jako v čase 0h (101 ± 8 % původní koncentrace v případě T47D a 105 ± 6 % v případě BT-20). V případě 10 μM 7-KC u buněčné linie T47D se hladina držela na 88 ± 5 % - 85 ± 3 % původní koncentrace v časech 1 – 24 hodin a následně klesla na 78 ± 0.2 % (48 hodin) - 78 ± 2 % (72 hodin) původní koncentrace (Obrázek 14C). K největšímu poklesu hladiny 7-KC v médiu potom došlo u buněčné linie MCF-7, dle hladina dosáhla 90 ± 0,1 % po 24 hodinách, 76 ± 1 % po 48 hodinách a 65 ± 7 % po 72 hodinách inkubace.



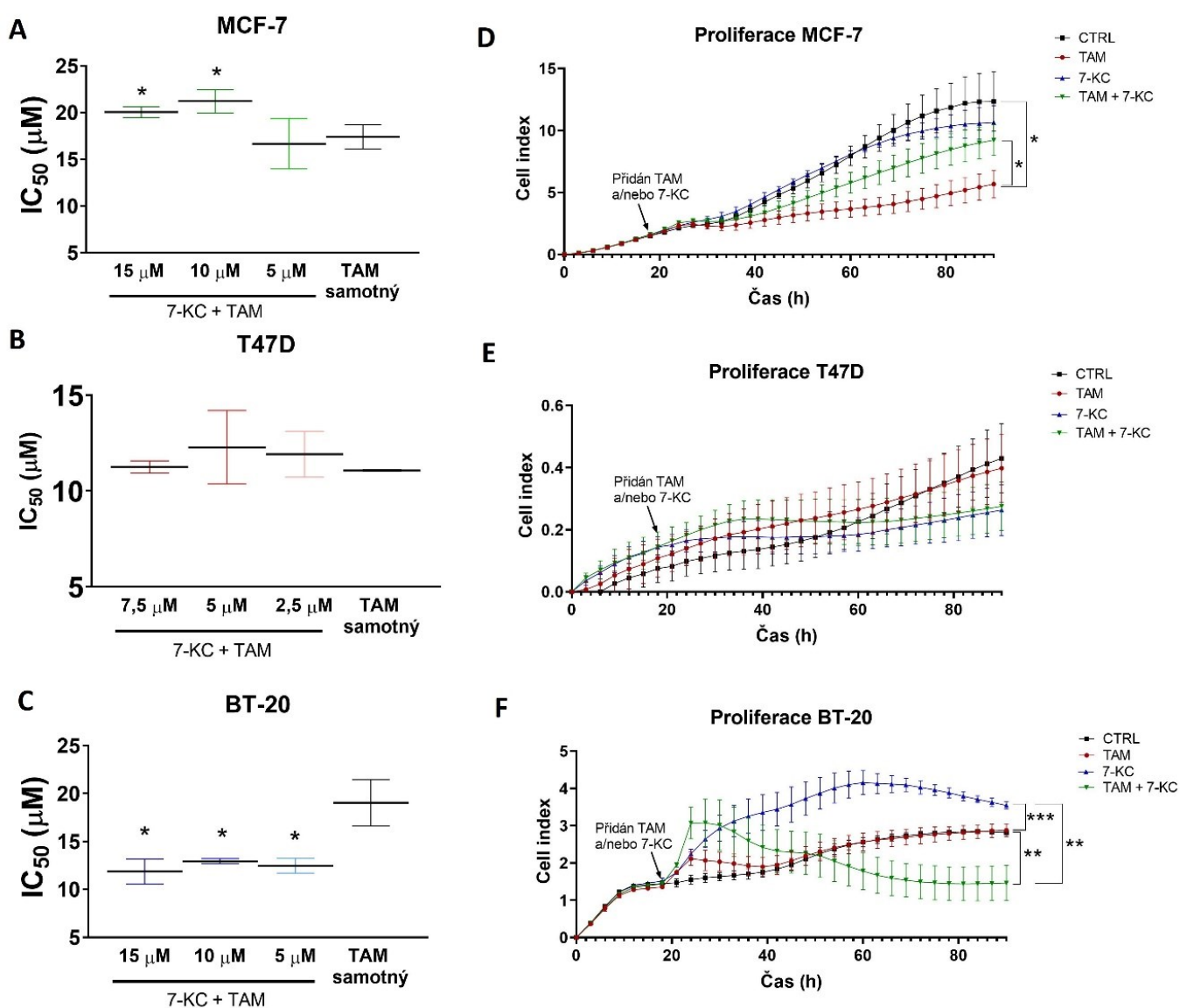
Obrázek 14: Stabilita 7-ketocholesterolu v kultivačním médiu

10 μM 7-KC byl přidán k buněčné linii MCF-7 (A), BT-20 (B) nebo T47D (C) a inkubován po dobu 72 hodin. V případě linie T47D byla analýza provedena také pro 5 μM 7-KC (D). V průběhu tohoto času bylo médium se 7-KC odebíráno a byla v něm analyzována hladina 7-KC. Hodnoty jsou zobrazeny jako průměr \pm směrodatná odchylka z měřených duplikátů. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$.

4.3.2 Změny buněčné viability a proliferace v přítomnosti tamoxifenu, 7-KC a jejich kombinace

Nejprve jsme stanovili hodnoty IC_{50} pro MCF-7, T47D a BT-20 linie inkubované se samotným 7-KC. Zjištěné hodnoty IC_{50} byly $21,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ u MCF-7, $11,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$ u T47D a $20,6 \pm 1,9 \mu\text{M}$ u buněčné linie BT-20. Buněčné linie jsme potom inkubovali jak se samotným tamoxifenem, tak s tamoxifenem v přítomnosti 7-KC o nízkých, subletálních koncentracích. V případě buněčné linie MCF-7 a BT-20 to byly koncentrace 5, 10 a 15 μM 7-KC a pro linii T47D pak 2,5, 5 a 7,5 μM . Ve srovnání se samotným tamoxifenem byla u buněk MCF-7 zjištěna významně vyšší hodnota IC_{50} pro tamoxifen v kombinaci s 10 μM 7-KC ($P = 0,021$) nebo 15 μM 7-KC ($P = 0,032$). U buněčné linie T47D nebyl v žádné z testovaných kombinací pozorován

významný rozdíl v IC_{50} pro tamoxifen. U buněčné linie BT-20 jsme pozorovali snížení IC_{50} pro všechny testované kombinace s 7-KC ($P=0,011$ pro $5 \mu\text{M}$, $P=0,012$ pro $10 \mu\text{M}$ a $P=0,011$ pro $15 \mu\text{M}$ 7-KC) (Obrázek 15 A, B, C).



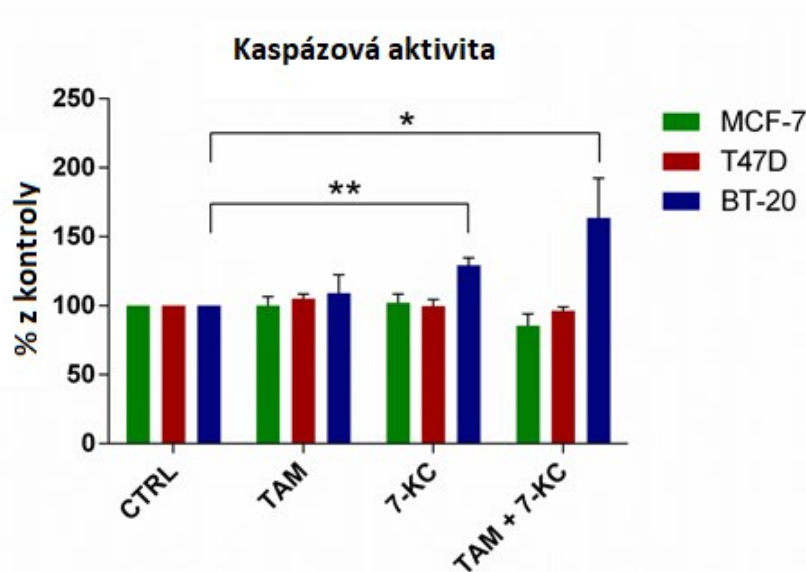
Obrázek 15: Vliv 7-ketocholesterolu na účinnost tamoxifenu

Porovnání hodnoty IC_{50} pro tamoxifen (TAM) samotný a v přítomnosti různých koncentrací 7-KC u buněčné linie (A) MCF-7, (B) T47D a (C) BT-20. Analýza buněčné proliferace v médiu (CTRL), v přítomnosti tamoxifenu (TAM), 7-KC a nebo jejich kombinace (TAM+7-KC) po dobu 72 hodin od přidání testovaných látek k buněčné linii (D) MCF-7, (E) T47D nebo (F) BT-20. Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka ze 3 nezávislých experimentů.

Pro další ověření tohoto výsledku byla následně analyzována buněčná proliferace v reálném čase na přístroji xCELLigence, kdy byly buňky inkubovány v samotném médiu (kontrola), s tamoxifenem, 7-KC nebo jejich kombinací. Výsledky ukázaly významně vyšší hladinu proliferace buněčné linie MCF-7 inkubované 72 h s tamoxifenem v kombinaci s 7-KC v porovnání s tamoxifenem samotným ($P=0,021$). U buněčné linie BT-20 byla naopak

zjištěna nižší proliferace po 72 h inkubaci s tamoxifenem a 7-KC ($P=0,008$). Proliferace buněčné linie T47D se významně nelišila ($P=0,190$ po 72 hodinách inkubace tamoxifenu s 7-KC ve srovnání s tamoxifenem samotným) (Obrázek 15 D, E, F).

Tyto výsledky podporuje také analýza kaspázové aktivity, ve které nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi aktivitou kaspáz 3/7 v ER+ buněčných liniích MCF-7 a T47D inkubovaných s tamoxifenem, 7-KC, nebo jejich kombinací. Naopak v ER- linii BT-20 byla zjištěna významně zvýšená aktivita kaspáz 3/7 po inkubaci s 7-KC ($P=0,002$) nebo kombinací 7-KC a tamoxifenu ($P=0,035$) (Obrázek 16).



Obrázek 16: Kaspázová aktivita v přítomnosti tamoxifenu (TAM), 7-KC, nebo jejich kombinace (TAM+7-KC)

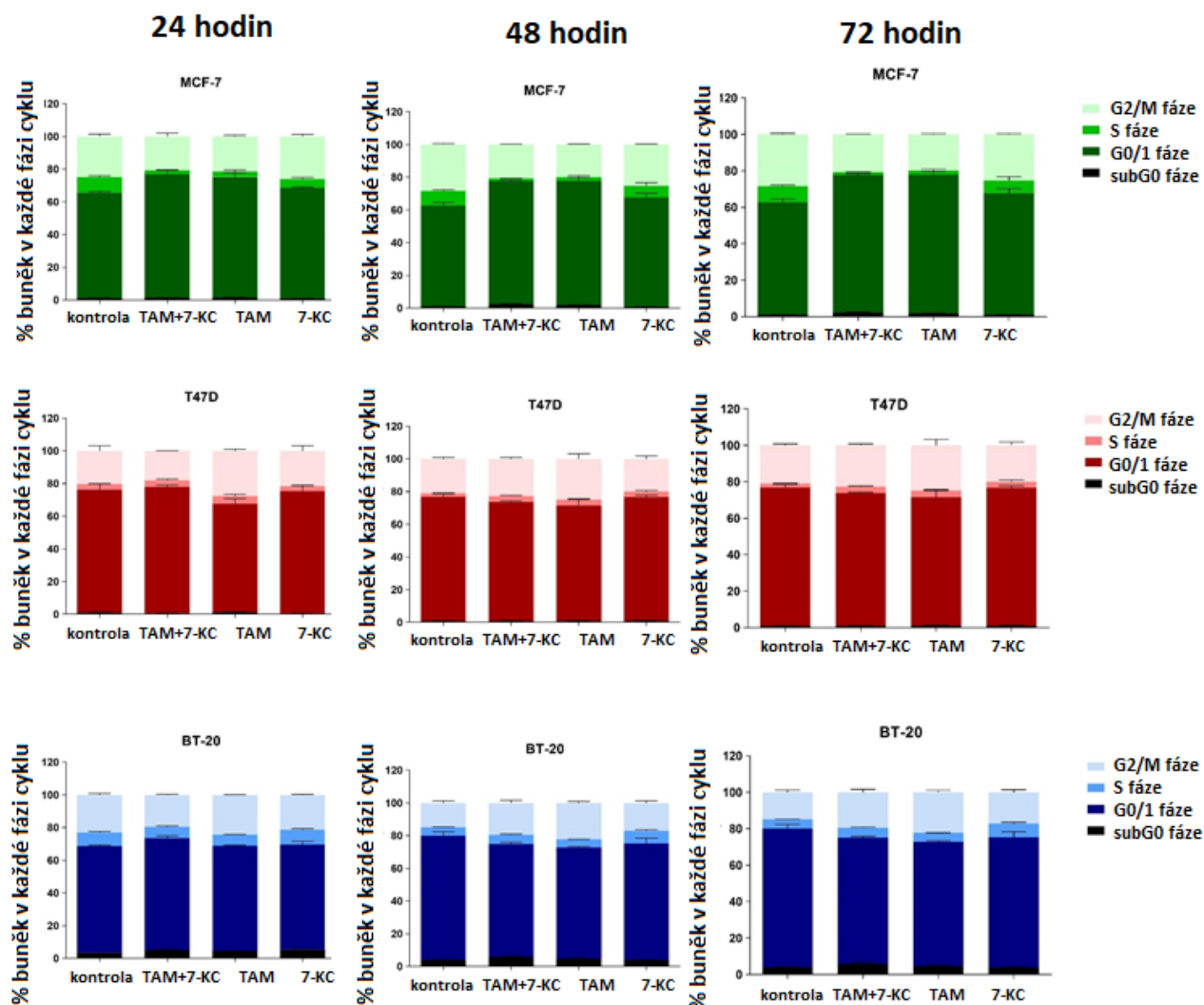
Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka ze 3 nezávislých experimentů. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$

4.3.3 Změny na úrovni buněčného cyklu

Pomocí průtokové cytometrie byl analyzován počet buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po 24, 48 a 72 hodinách inkubace s tamoxifenem, 7-KC nebo jejich kombinací. V případě buněčných linií BT-20 a T47D byly po 24 hodinách inkubace s tamoxifenem nebo kombinací tamoxifenu s 7-KC pozorovány pouze nepatrné změny v rozložení fází buněčného cyklu. Navíc, po 48 a 72 hodinách inkubace nebyly patrné žádné statisticky významné změny.

U buněčné linie MCF-7 byla zjištěna statisticky významná změna (snížení) počtu buněk v S fázi buněčného cyklu u buněk inkubovaných s kombinací tamoxifenu a 7-KC po 24 ($P=0,040$) i 48 hodinách ($P=0,021$) v porovnání s kontrolními buňkami. Po 72 hodinách inkubace vykazovaly buňky v přítomnosti tamoxifenu nebo kombinace obou látek významně deregulovaný buněčný cyklus ve všech fázích ve srovnání s kontrolou.

U žádných buněk kultivovaných pouze s 7-KC nebyly zjištěny významné změny v rozložení buněk do jednotlivých fází buněčného cyklu ve srovnání s kontrolou (Obrázek 17).



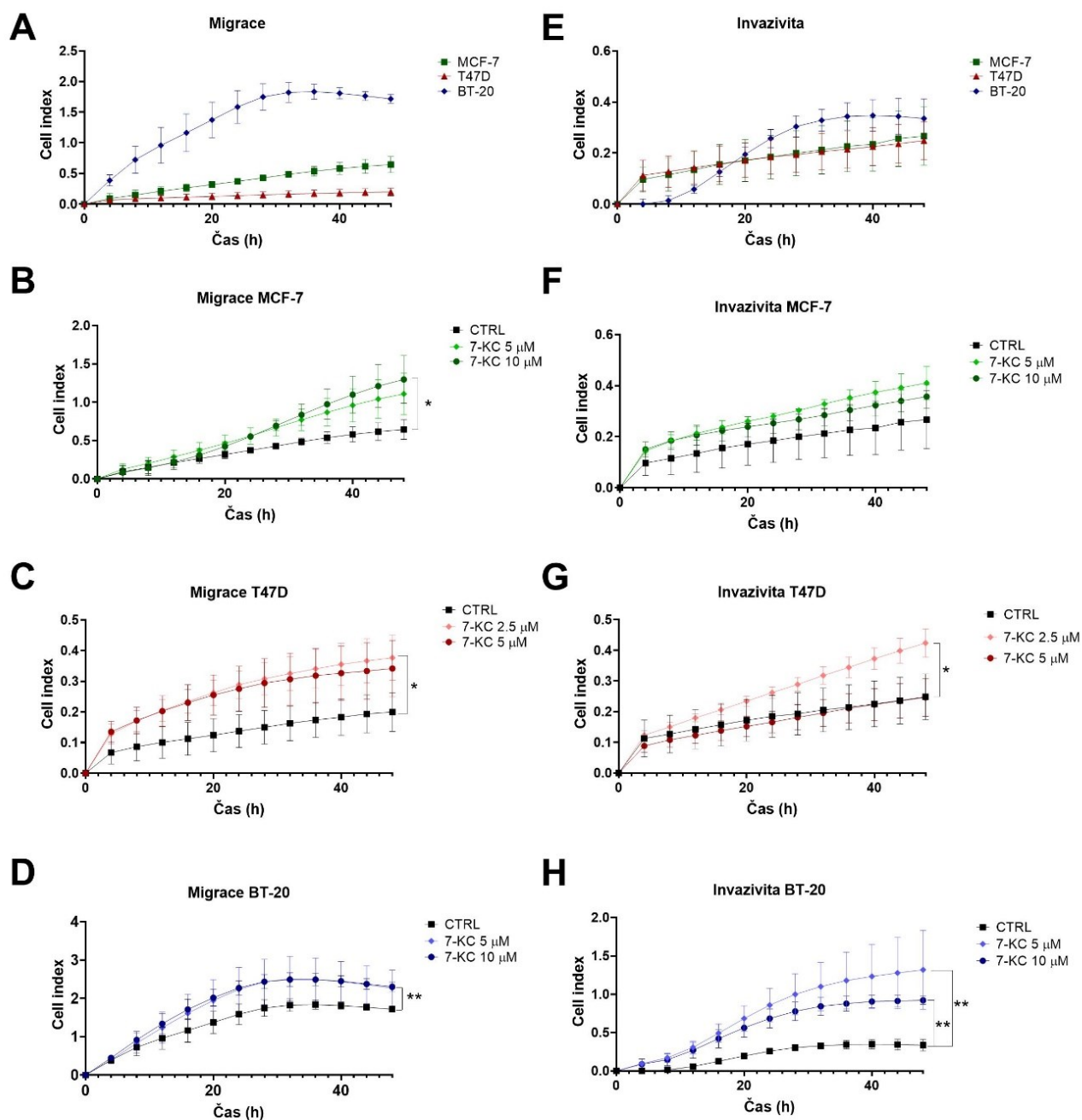
Obrázek 17: Změny v buněčném cyklu v buněčných liniích v přítomnosti tamoxifenu (TAM), 7-KC nebo jejich kombinace (TAM+7-KC).

Grafy ukazují změny rozložení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po 24, 48 a 72 hodinách inkubace s testovanými látkami. Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka ze dvou nezávislých experimentů.

4.3.4 Změny buněčné migrace a invazivity v přítomnosti 7-ketocholesterolu

V další části *in vitro* studie vlivu 7-KC na buněčné linie karcinomu prsu byl analyzován vliv přítomnosti 7-KC na buněčnou migraci a invazivitu. U ER- buněčné linie BT-20 byla zjištěna významně zvýšená migrace buněk po 24 ($P=0,023$) i 48 hodinách ($P=0,002$) inkubace s $10 \mu\text{M}$ 7-KC v porovnání s kontrolními buňkami. Rovněž invazivní potenciál buněk BT-20 byl významně vyšší, a to v přítomnosti jak $5 \mu\text{M}$ 7-KC po 24 ($P=0,002$) i 48 hodinách

($P=0,006$), tak $10 \mu\text{M}$ 7-KC po 24 hodinách ($P=0,003$) i 48 hodinách ($P=0,003$) (Obrázek 18D a H).



Obrázek 18: Migrace a invazivita buněčných linií v přítomnosti 7-ketocholesterolu
 Buněčné linie byly pěstovány v přítomnosti $5 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$ 7-KC (linie MCF-7 a BT-20) nebo $2,5 \mu\text{M}$ a $5 \mu\text{M}$ 7-KC (T47D). Míra invaze a migrace buněk je vyjádřena prostřednictvím bezrozměrné jednotky Cell index, která vyjadřuje hodnotu impedance stanovenou na přístroji xCELLigence.
 Obrázky A a E znázorňují porovnání buněčné migrace (A) a invazivity (E) všech testovaných buněčných linií mezi sebou. Obrázky B - D znázorňují migraci buněčných linií MCF-7 (B), T47D (C) a BT-20 (D) v přítomnosti 7-KC, obrázky F - H znázorňují invazivitu linií MCF-7 (F), T47D (G) a BT-20 (H) v přítomnosti 7-KC. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka ze 3 nezávislých experimentů- * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$.

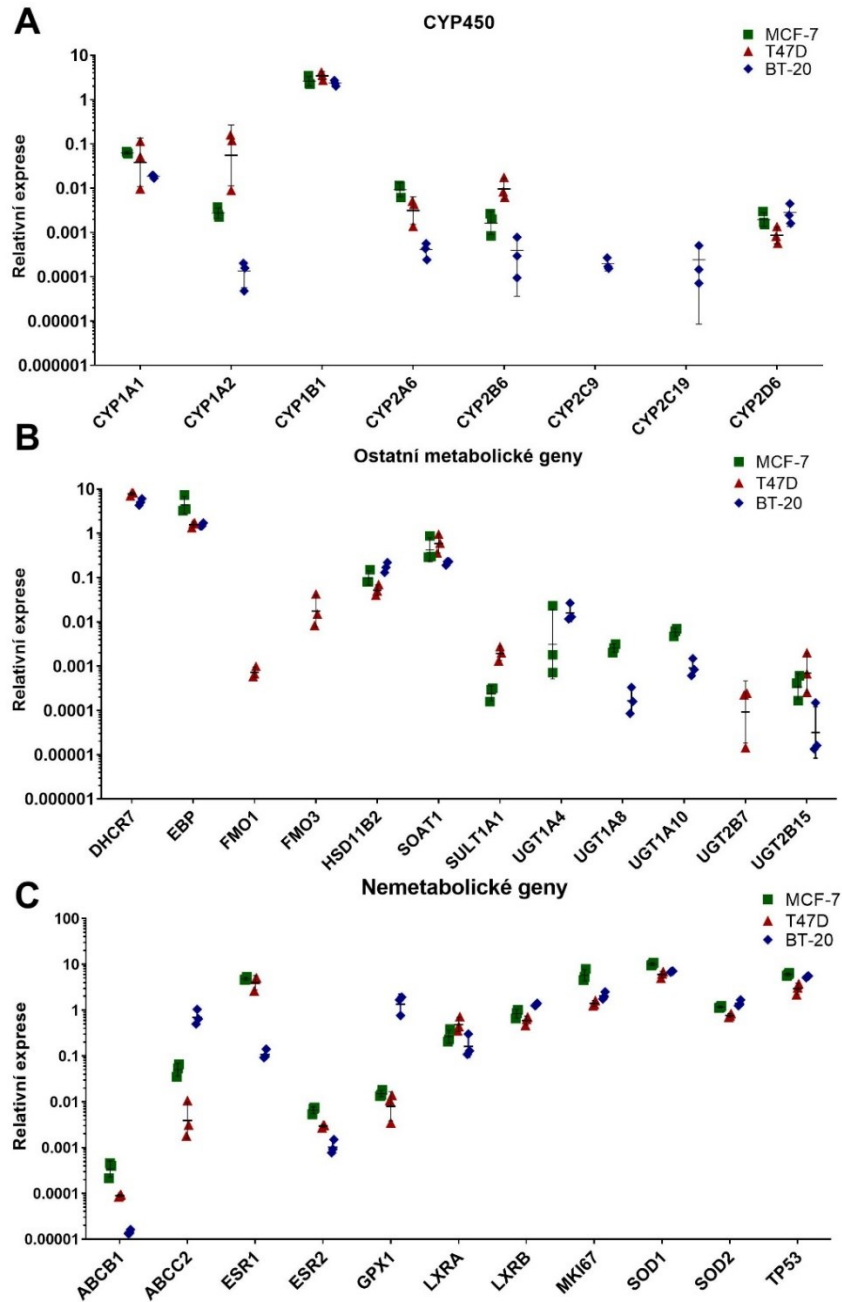
U ER+ buněčné linie MCF-7 byl zjištěn statisticky signifikantně vyšší migrační potenciál buněk po 24 ($P=0,001$) a 48 ($P=0,029$) hodinách v přítomnosti $10\mu\text{M}$ 7-KC. V případě $5\mu\text{M}$ 7-KC byl tento potenciál také signifikantně vyšší po 24 hodinách ($P=0,044$), avšak již za hranicím signifikance po 48 hodinách inkubace ($P=0,055$). Buněčná invazivita u linie MCF-7 však nebyla v přítomnosti 7-Kc zvýšená ani u jedné z testovaných koncentrací 7-KC (Obrázek 18F). Další ER+ line T47D migrovala významně více než kontrolní buňky v čase 24 ($P=0,020$) i 48 hodin ($P=0,034$) po přidání $2,5\mu\text{M}$ 7-KC. V přítomnosti $2,5\mu\text{M}$ 7-KC byl rovněž zjištěn vyšší invazivní potenciál po 48 hodinách ($P=0,034$).

Porovnání kontrol pro BT-20, MCF-7 a T47D navzájem navíc ukázalo na velmi nízký migrační potenciál T47D ve srovnání s liniemi MCF-7 a BT-20 (Obrázek 18A). Migrace kontrol s přidáním ethanolu, který byl použitý k rozpuštění 7-KC, se nelišily od kontrol v kultivačním médiu.

4.3.5 Změny na úrovni genové exprese

V další fázi jsme se zaměřili na analýzu genové exprese 36 genů kódujících zejména enzymy z metabolismu TAM (Brauch *et al.* 2009). Do studie jsme zařadili také geny související s metabolismem 7-KC, markery oxidačního stresu, vybrané ABC transportéry, intracelulární receptory, geny kódující AEBS a vybrané onkodrivery.

Změny genové exprese byly sledovány ve všech testovaných buněčných liniích po inkubaci s tamoxifenem, 7-KC nebo jejich kombinací. Exprese pěti genů (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *HSD11B1*, *SULT2A1* a *SULT1E1*) byla pod hranicí detekce ($Ct > 40$) u všech třech testovaných linií a z další analýzy byly tedy vyřazeny. Exprese některých dalších genů byla potom detekována jen v některých buněčných liniích, kdežto v jiných byla opět pod hranicí detekce. Hladina exprese genů *FMO1*, *FMO3* a *UGT2B7* byla pod hranicí detekce v BT-20 a MCF-7, ale v T47D byla exprese těchto genů měřitelná. Exprese genů *UGT1A4*, *UGT1A8* a *UGT1A10* nebyla zjištěna v T47D, ale naopak byla stanovena v MCF-7 a BT-20. Hladiny exprese *CYP2C9* a *CYP2C19* nebyly detekovatelné u MCF-7 a T47D a hladina exprese genu *SULT1A1* byla pod limitem detekce u buněčné linie BT-20 (Obrázek 19). Exprese 12 genů, jejichž exprese byla detekována alespoň v jedné buněčné linii, nevykazovala signifikantní deregulaci (*CYP2C9*, *FMO1*, *FMO3*, *GPX1*, *LXRA*, *LXRB*, *SOD1*, *SOD2*, *SULT1A1*, *TP53*, *UGT1A4* a *UGT2B7*) v testovaných podmínkách.



Obrázek 19: Porovnání hladiny genové exprese cílových genů v kontrolních buňkách
 Grafy znázorňují expresi genů (A) z rodiny cytochromu P450, (B) dalších genů metabolismu tamoxifenu a (C) ostatních genů ve studovaných buněčných liniích. Hodnoty jsou znázorněny jako geometrický průměr \pm geometrická směrodatná odchylka relativní exprese ($2^{-\Delta Ct}$) ze tří nezávislých experimentů.

Významná deregulace byla zjištěna u 19 genů, z toho bylo 7 genů z rodiny cytochromu P450. *CYP1A1* a *CYP1B1*, byly přitom deregulovány opačným směrem v ER⁺ linii MCF-7 a v ER⁻ linii BT-20 (Obrázek 20A-B). Expese obou genů byla zvýšená v linii MCF-7 a naopak snižená v linii BT-20. Expese *CYP1B1* v buňkách MCF-7 byla navíc zvýšená v přítomnosti

tamoxifenu, ale 7-KC její expresi nijak neměnil. Naopak v buněčné linii BT-20 byla snížená exprese zaznamenána v přítomnosti 7-KC, ale nikoliv samotného tamoxifenu (Obrázek 20B).

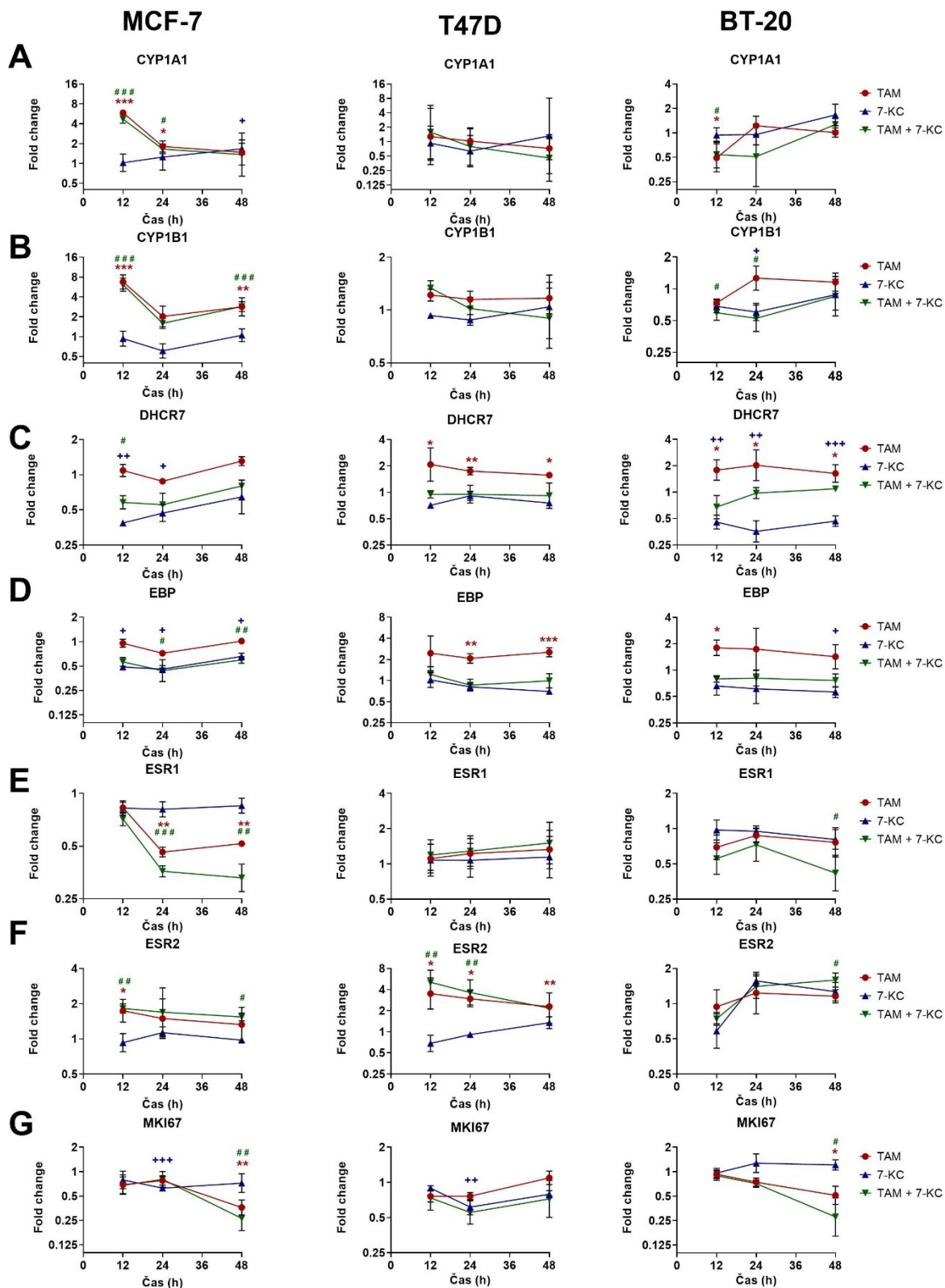
Geny *DHCR7* a *EBP* vykazovaly sníženou expresi u buněk MCF-7 ošetřených 7-KC a/nebo TAM+7-KC, ale u buněk ošetřených pouze TAM nebyla zjištěna žádná významná změna. Naopak u buněk T47D ošetřených pouze TAM došlo ke zvýšení exprese těchto genů, v případě zbylých dvou testovaných podmínek nebyla exprese významně změněna. U buněčné linie BT-20 došlo k významnému zvýšení exprese u buněk ošetřených TAM a naopak ke snížení u buněk ošetřených 7-KC. V případě vzorků TAM+7-KC nebyla exprese významně změněna (Obrázek 20C a D). Exprese *HSD11B2* byla nižší u buněk MCF-7 a BT-20 inkubovaných s TAM a/nebo TAM+7-KC, ale u buněčné linie T47D nebyla zjištěna žádná významná změna. Exprese genu *SOAT1* byla významně zvýšena pouze u buněk BT-20 ošetřených TAM a/nebo kombinací TAM+7-KC.

Gen *ESR1* kódující ER α vykazoval sníženou expresi v přítomnosti tamoxifenu či kombinace obou látek u MCF-7 i BT-20, ale u buněčné linie T47D nebyly detekovány změny za žádných z testovaných podmínek. (Obrázek 20E). Na rozdíl od genu *ESR1*, exprese genu *ESR2*, který kóduje ER β , byla zvýšena v přítomnosti tamoxifenu nebo jeho kombinace s 7-KC u všech testovaných buněčných linií (Obrázek 20F).

Gen *MKI67*, který je považován za marker proliferace, vykazoval sníženou expresi ve všech testovaných liniích. Nejnižší exprese byla zjištěna u buněčné linie MCF-7 a BT-20 v přítomnosti tamoxifenu samotného i v kombinaci s 7-KC po 48 hodinách inkubace (Obrázek 20G).

Expresí UDP-glykosyltransferáz se blížila limitu detekce (Ct=40) a jemné změny jejich hladin nebylo možné spolehlivě vyhodnotit. Analýza genové exprese ukázala také na statisticky významně zvýšenou hladinu exprese genů *ABCB1* a *ABCC2* u buněčné linie BT-20. Je však třeba dodat, že exprese genu *ABCB1* se také blížila limitu detekce ve všech buněčných liniích, zejména však právě u BT-20 (Obrázek 19C).

Statistické porovnání exprese v buňkách inkubovaných s tamoxifenem s buňkami inkubovanými s kombinací obou látek ukázalo signifikantně sníženou expresi *CYP1B1* v BT-20 po 24-hodinové inkubaci (FC = 0,4, P=0,017). Inkubace MCF-7 s kombinací obou látek významně zvýšila expresi *ABCB1* (FC = 2,2, P=0,027) a snížila expresi *ESR1* po 48 hodinách (FC = 0,6, P=0,012) v porovnání s hladinami po samotném tamoxifenu. V T47D způsobila inkubace s oběma látkami významné zvýšení exprese *CYP2D6* po 48 hodinách (FC=1,6, P=0,006). V případě exprese genů *DHCR7* a *EBP* byl signifikantní rozdíl mezi vzorky ošetřenými TAM a TAM+7-KC pozorován u všech třech buněčných linií.

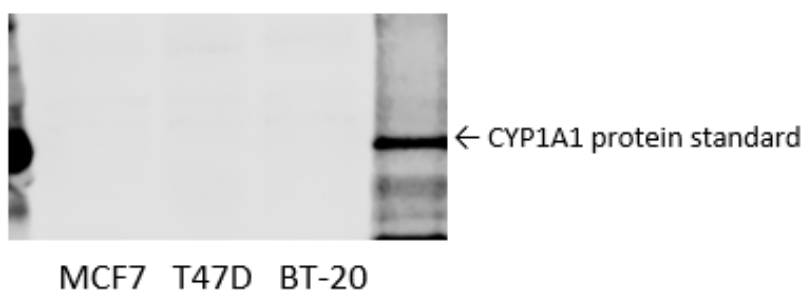


Obrázek 20: Změny v expresi vybraných genů vlivem inkubace se studovanými látkami
 Výsledky deregulace genové exprese v buněčných liniích MCF-7, T47D a BT-20 po 12, 24 a 48 hodinách inkubace s tamoxifenem (TAM), 7-KC, nebo jejich kombinací (TAM+7-KC). Změny jsou prezentovány jako fold change hodnoty vztažené k expresi v kontrolních buňkách pěstovaných na čistém kultivačním médiu. Hodnoty jsou prezentovány jako geometrický průměr ± geometrická

směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů. Signifikantní výsledky pro TAM jsou znázorněny jako * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0.001$. Výsledky pro 7-KC jsou obdobně vyznačeny znaménkem + a hodnoty pro porovnání kontrolních buněk s buňkami s TAM+7-KC jsou vyznačeny znakem #.

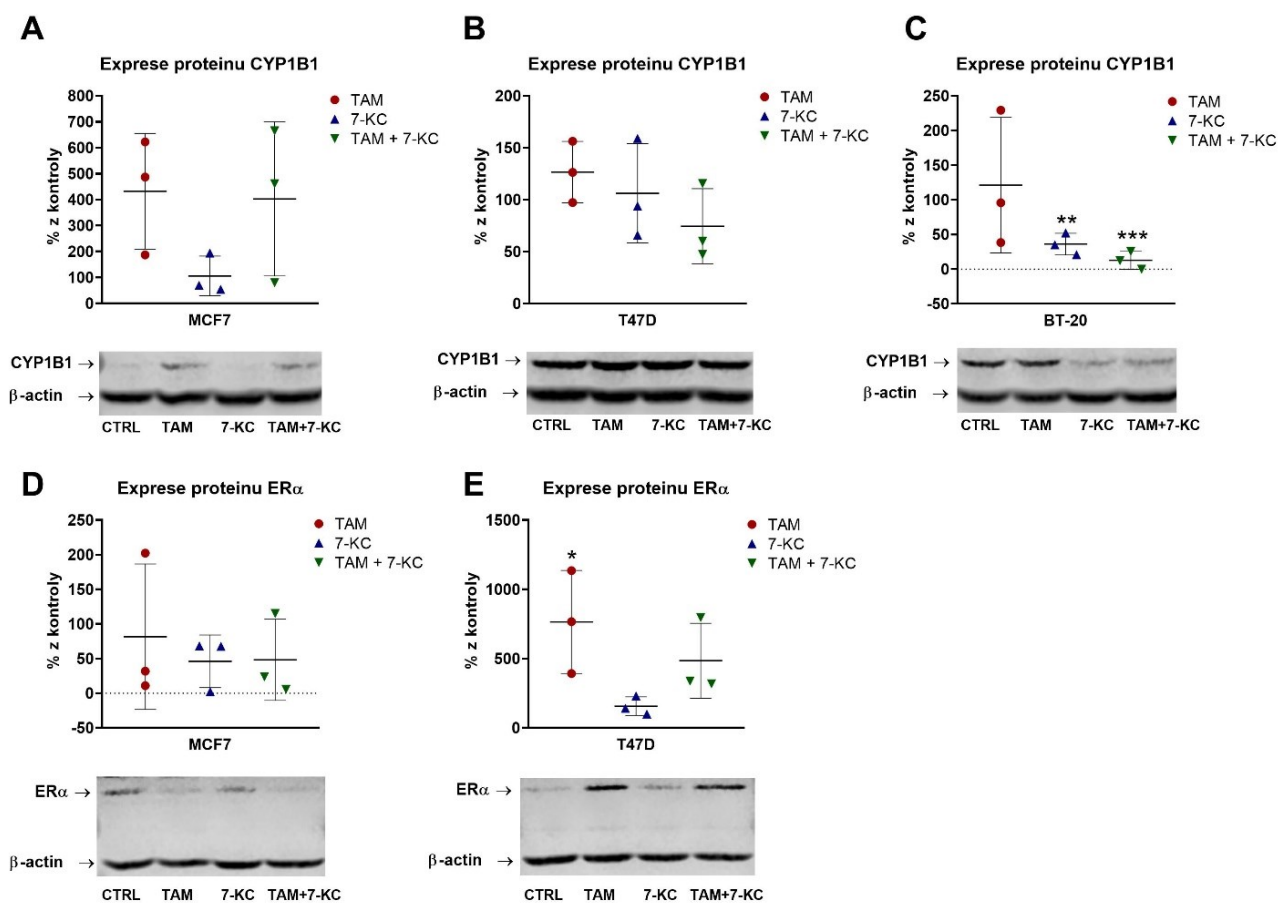
4.3.6 Změny na úrovni exprese proteinu

Výsledky exprese vybraných genů (*CYP1A1*, *CYP1B1* a *ESR1*) byly v další fázi validovány také na úrovni hladin proteinu. Protein CYP1A1 nebylo možné detekovat v žádné ze studovaných linií (Obrázek 21).



Obrázek 21: Western blot pro detekci proteinu CYP1A1

Naopak exprese proteinu CYP1B1 byla detekována ve všech třech testovaných liniích. Výsledky potvrdily předchozí pozorování na úrovni genové exprese. V buněčné linii BT-20 byla hladina CYP1B1 proteinu signifikantně nižší po inkubaci s 7-KC ($P=0,002$) i kombinací obou látek ($P<0,001$) (Obrázek 22C). V MCF-7 bylo pozorováno zvýšení hladiny CYP1B1 proteinu po tamoxifenu i kombinaci obou látek, avšak kvůli velkým rozdílům mezi triplikáty nebylo toto zvýšení statisticky signifikantní (Obrázek 22A). V buněčné linii T47D nebyl rozdíl v expresi proteinu CYP1B1 detekován.



Obrázek 22: Rozdíly hladin proteinu CYP1B1 a ER α v buněčných liniích po inkubaci se studovanými látkami

Protein ER α byl detekovatelný pouze v ER+ buněčných liniích MCF-7 a T47D, ale ne v ER- BT-20. Oproti výsledkům na úrovni mRNA nebyly u buněčné linie MCF-7 v případě exprese ER α zjištěny signifikantní změny v expresi na úrovni proteinu. Oproti tomu byla však pozorována významně zvýšená exprese ER α v buněčné linii T47D po inkubaci s tamoxifenem ($P=0,036$). Samotný 7-KC ani 7-KC v kombinaci s tamoxifenem hladinu proteinu ER α nezměnil (Obrázek 22D-E) ($P>0,05$).

5. Diskuze

Dle současného stavu poznání je nepopiratelné, že oxysteroly mohou u nádorových onemocnění hrát velmi významnou roli, ať už v samotném procesu karcinogeneze, ovlivnění proliferace nádorových buněk, ale i aktivity imunitních buněk, které jsou pro nádorové mikroprostředí velmi významné. Jejich vliv se může projevit i v procesu metastazování díky ovlivnění buněčné migrace a invazivity a vlivu na proces EMT. V konečném důsledku pak kolísání hladin oxysterolů a eventuálně další změny, které jej doprovázejí, mohou ovlivnit působení a výsledky protinádorové terapie, jak bylo popsáno v případě různých oxysterolů i léčiv. Je tedy zásadní se problematikou oxysterolů dále zabývat a prohlubovat znalosti o jejich velmi komplexním působení na úrovni jednotlivých buněk, tkání i celého organismu.

Cílem této dizertační práce bylo blíže objasnit úlohu oxysterolů u karcinomu prsu. Karcinom prsu je nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním u žen, celosvětová incidence v roce 2020 tvořila 24,5 % (2 261 419 případů) všech diagnostikovaných onkologických onemocnění u žen, mortalita potom tvořila 15,5 % (674 996 případů) všech úmrtí na nádorová onemocnění (Sung *et al.* 2021) což činí z karcinomu prsu nejčastější příčinu úmrtí na nádorové onemocnění u žen. Součástí terapie u pacientek s ER pozitivními nádory je obvykle hormonální terapie, nejčastěji selektivní modulátory estrogenových receptorů jako je tamoxifen, či inhibitory aromatázy. Přetrvávajícím problémem je však rezistence k této terapii, ať už primární, kdy nádor na terapii nereaguje od počátku, nebo sekundární - získaná v průběhu terapie (Lei *et al.* 2019), případně špatná tolerance, která vede ke změně léčby. Cílem mnoha současných studií je proto hledání nových prognostických biomarkerů u pacientek s tímto onemocněním.

První studie předkládaná v této dizertační práci se proto zaměřila na stanovení genové exprese vybraných faktorů oxysterolové dráhy, či metabolismu a transportu oxysterolů a porovnávala tyto výsledky s klinicko-patologickými daty pacientek za účelem identifikace potenciálních prognostických biomarkerů. Na základě tohoto porovnání byla zjištěna významná asociace mezi sledovanými daty a expresí 16 studovaných genů. Mezi studovanými ABC transportéry klesala exprese genů *ABCA9*, *ABCA10* a *ABCG2* podle histologického stupně (grade) nádoru ve směru G1 > G2 > G3, u genu *ABCG2* byl tento trend významný také u stádia nádoru ve směru SI > SII > SIII a navíc byl zjištěn vztah mezi vyšší expresí tohoto genu a delším bezpříznakovým přežíváním pacientek. Celkově tedy je vyšší hladina transkriptu *ABCG2* spojena s lepšími prognostickými znaky (nižší grade i stádium) a navíc s prodlouženým

přežíváním pacientek. Z těchto důvodů jsme předpokládali, že by tento gen mohl být vhodným prognostickým biomarkerem.

Proteiny z rodiny ABCA a ABCG patří obecně mezi transportéry lipidů a steroidních molekul (Kerr *et al.* 2011), rodina ABCG navíc patří mezi transportéry xenobiotik a je spojována s rezistencí k protinádorové terapii (Mo and Zhang 2012). Exprese transkriptu (*ABCA9*, *ABCA10*) či aktivita proteinu (*ABCG2*) je u těchto transportérů navíc ovlivněna přítomností cholesterolu a dalších sterolů (Piehler *et al.* 2002; Telbisz *et al.* 2013; Wenzel *et al.* 2003). Na rozdíl od dalších proteinů z těchto rodin (*ABCA1*, *ABCG1*) patří však tyto transportéry z hlediska jejich endogenních substrátů mezi málo prostudované a nebyla pro ně zatím popsána přímá interakce s oxysteroly. Výsledky získané v naší práci potvrzují také výsledky studií na dalších typech karcinomů, kdy exprese *ABCA9*, *ABCA10* i *ABCG2* byla významně nižší ve vzorcích epiteliálního ovariálního karcinomu oproti nemaligním vzorkům vaječníků a vyšší exprese všech tří genů byla navíc asociována s delší dobou do progresu (Elsnerova *et al.* 2016). Genová exprese *ABCA10* byla snižena u pacientek s karcinomem prsu vyššího stádia (stage) a souvisela s kratším celkovým přežíváním a infiltrací nádorového prostředí imunitními buňkami (Chu *et al.* 2022). Hladina *ABCA9* a *ABCA10* byla také významně snižena ve vzorcích plicního adenokarcinomu v porovnání s kontrolní nemaligní tkání (Yang *et al.* 2022), či u pacientek s karcinomem prsu (Hlaváč *et al.* 2013). Poslední zmiňovaná studie však nezjistila signifikantní rozdíl v expresi genu *ABCG2*. Nicméně citovaná práce prostudovala expresní profil na souboru pacientek se všemi subtypy karcinomu prsu, zatímco aktuálně předkládaná studie se zaměřila pouze na pacientky s ER pozitivními karcinomy a hormonální léčbou.

ABCG2, jinak jaké BCRP (z angl. breast cancer resistance protein), patří, jak již bylo naznačeno, do rodiny ABC transportérů, která zajišťuje mimo jiné eflux protinádorových léčiv z buňky a přispívá tak k mnohočetné lékové rezistenci. Mezi substráty *ABCG2* patří např. inhibitory topoizomeráz, antracykliny, či tyrosin-kinázové inhibitory (Mo and Zhang 2012). Tomuto efektu odpovídají výsledky studií např. u pacientů s osteosarkomem, kde byla exprese *ABCG2* vyšší v nádorové tkáni a vyšší exprese souvisela s kratším bezpříznakovým přežíváním a rezistencí pacientů na léčbu doxorubicinem (Shu *et al.* 2021). Podobně tomu bylo také ve studii analyzující expresi *ABCG2* u pacientů s karcinomem žaludku, jejichž terapeutický režim zahrnoval cisplatinu – i zde byla vyšší exprese *ABCG2* spojena s kratším bezpříznakovým přežíváním (Zhang *et al.* 2013). V případě předkládané práce byla zjištěna souvislost s vyšší expresí *ABCG2* a delším bezpříznakovým přežíváním. Zjevně tak *ABCG2* působí specificky podle typu onemocnění a zejména podané terapie. Stejný trend byl potvrzen také na řadě dalších

nádorových onemocněních, jako je karcinom kůry nadledvin, glioblastom, nebo karcinom ledvin (Lyu *et al.* 2022), kde byla zjištěna vyšší exprese *ABCG2* u déle přežívajících pacientů, a dále endocervikální adenokarcinom, adenokarcinom plic, sarkom, či karcinom štítné žlázy, kde byla vyšší exprese *ABCG2* pozorována v souvislosti s delším bezpříznakovým přežíváním pacientů (Lyu *et al.* 2022). Zdá se tedy, že význam transportéru *ABCG2* u nádorových onemocnění je mnohem komplexnější, o čemž svědčí recentní přehledový článek, který shrnul různé aspekty, jež mají na expresi (mRNA a/nebo proteinu) a regulaci aktivity *ABCG2* vliv. Mezi tyto jevy patří infekce, zánětlivé prostředí, poranění tkání, stres endoplasmatického retikula, řada různých onemocnění, vystavení xenobiotikům, či kolísání hladiny cholesterolu (Kukal *et al.* 2021). V neposlední řadě je třeba zmínit také genetickou variabilitu *ABCG2* – kupříkladu analýza dat z TCGA a dalších databází ukazují delší celkové i bezpříznakové přežívání u pacientek s karcinomem endometria v případě výskytu alterací v tomto nádoru (tzv. mutační zátěž nádoru - tumor mutational burden) v genu *ABCG2* v porovnání s nádory, kde alterace v tomto genu nebyly přítomny (Lyu *et al.* 2022). Vliv genetické variability byl potvrzen také ve velmi nedávné studii publikované skupinou naší laboratoře, kde byla zjištěna souvislost mezi přítomností zárodečného polymorfismu rs2231156 genu *ABCG2* a delším bezpříznakovým přežíváním u pacientek s ER pozitivním subtypem karcinomu prsu (Holý *et al.* 2022).

Další skupinou genů, jejichž exprese byla shodně snížena u pokročilejšího stádia (stage) a/nebo vyššího histologického stupně (grade) jsou *CH25H*, *CYP7B1*, *CYP24A1* a *CYP39A1*. Gen *CH25H* kóduje cholesterol-25-hydroxylázu, která má na svědomí syntézu 25-HC a jeho prognostický význam u pacientek s karcinomem prsu byl již nastíněn v předchozí studii, kde byla vyšší exprese *CH25H* významně asociována s delším přežíváním pacientek bez metastáz (Mittempergher *et al.* 2013). Naše studie však asociaci s bezpříznakovým přežíváním pacientek nezjistila. Recentní studie potvrdila naše výsledky pro vztah stádia nádoru a exprese *CH25H* u pacientek s karcinomem prsu (Uddin and Wang 2022). Zdá se tedy, že by exprese *CH25H* mohla by sloužit jako biomarker časného i pozdního procesu metastazování a *CH25H* je tedy zajímavým kandidátem s potenciálním prognostickým významem u karcinomu prsu, ale patrně také u dalších nádorových onemocnění, jako například u duktálního adenokarcinomu pankreatu (McBrearty *et al.* 2023).

CYP7B1 katalyzuje přeměnu 27-HC na 7 α ,27-dihydroxycholesterol. Přítomnost 27-HC přispívá k růstu nádorů (Wu *et al.* 2013) a nižší hladina exprese *CYP7B1* v důsledku hypermethylace promotoru způsobuje akumulaci 27-HC v buňce (Shi *et al.* 2019) a přispívá tak k rozvoji karcinomu prsu. Nižší hladina související s vyšším stádiem nádoru a stádiem,

zjištěná v naší studii, tedy velmi dobře odpovídá těmto zjištěním. Autoři předchozí studie navíc zjistili vztah mezi kratším celkovým přežíváním pacientek s karcinomem prsu a nižší expresí *CYP7B1* (Wu *et al.* 2013), avšak v naší práci jsme však statisticky významnou souvislost s bezpříznakovým přežíváním pacientek nezjistili. Novější studie, analyzující hladiny *CYP7B1* na proteinové úrovni, nezjistila významnou asociaci se stádiem, ani histologickým stupněm nádoru u pacientek s karcinomem prsu (Le Cornet *et al.* 2020). Význam tohoto genu/proteinu jakožto potenciálního nádorového biomarkeru je tedy zatím nejednoznačný a pro jeho objasnění jsou potřeba další analýzy.

CYP24A1 je nejprostudovanější v souvislosti s metabolismem vitamínu D3 ve směru jeho další oxidace a následného vylučování. *CYP24A1* je považován za potenciální onkogen, jehož vyšší exprese souvisí např. s kratším celkovým přežíváním u pacientek s karcinomem prsu. Jeho význam u karcinomu prsu, prostaty, nebo kolorektálního karcinomu shrnuje recentní přehledový článek (Kamiya *et al.* 2023). Jedná se tedy o dobře prostudovaný gen, který je navrhován jako potenciální metabolický cíl v souvislosti s vitamínem D, avšak studie popisující vztahy k oxysterolům zcela chybí a bez nezávislého potvrzení našich výsledků jeho význam nebude dále podrobněji diskutován.

Enzym *CYP39A1* se účastní metabolismu 24-HC na 7 α -hydroxylované oxysteroly ve směru syntézy žlučových kyselin. 24-HC je oxysterol související zejména s neurologickými funkcemi a patologiemi, nicméně existují i práce zabývající se významem *CYP39A1* u nádorových onemocnění. U karcinomu ovaria byla hypermethylace promotoru *CYP39A1* spojena s horší prognózou pacientek (Huang *et al.* 2009). Nižší exprese tohoto genu byla dále asociována s horší prognózou a přítomností metastáz u pacientů s cholangiokarcinomem (Khenjanta *et al.* 2014). Snížená exprese byla dále zjištěna ve vzorcích melanomu (Sumantran *et al.* 2016) a také u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (Ji *et al.* 2022). Žádná další studie, mimo předkládané dizertační práce, však nestudovala význam tohoto genu u pacientek s karcinomem prsu. Naše výsledky jsou ve shodě s ostatními pracemi, kde je exprese tohoto genu nižší v nádorových tkáních v porovnání s nemaligními kontrolami a jeho exprese je dále snížena u pokročilejšího stádia onemocnění. V budoucnu bude potřeba provést další studie na větším a nezávislém souboru pacientů, než bude možné rozhodnout, zda by *CYP39A1* mohl sloužit jako potenciální prognostický biomarker.

Další geny metabolismu oxysterolů (*DHCR7*, *EBP*) neprokázaly významnou asociaci se stádiem nádoru nebo histologických stupněm, ale byly zjištěny významné vztahy se stavem HER2 receptoru a/nebo se subtypem karcinomu prsu (luminal A vs. luminal B). Subtyp luminal B má horší prognózu ve srovnání se subtypem A (Yang *et al.* 2023). Exprese obou genů byla

v našem případě vyšší u subtypu luminal B v porovnání s luminal A. Tato dvojice enzymů tvoří dohromady komplex AEBS, který byl blíže popsán v kapitolách 1.3.1.6 a 1.3.4.1 – tento komplex má na svědomí syntézu CT z α/β -EC, je schopný vázat tamoxifen a také některé oxysteroly. Jeho působení může tedy potenciálně interagovat s účinky hormonální terapie. Navzdory těmto úvahám s potenciálním významem u karcinomu prsu se nám však nepodařilo najít vztah exprese těchto enzymů s nádorovým grade/stage, či bezpříznakovým přežíváním pacientek.

Mezi regulačními geny, které opět významně souvisely s nádorovým stage a/nebo grade můžeme zmínit *RXRA* (kódující transkripční faktor RXR α) nebo gen *PPARGCIA* kódující koaktivátor transkripčního genu PPAR γ . Tyto transkripční faktory regulují zejména expresi genů souvisejících s transportem a metabolismem lipidů. RXR α může tvořit heterodimery jak s dalšími proteiny RXR, tak s receptory LXR, i vzájemně s transkripčním faktorem PPAR γ a jejich nesprávná funkce může vést k rozvoji malignit (Shimizu and Moriwaki 2008). Účinky tohoto heterodimeru působí obecně ve směru zpomalení buněčného růstu a/nebo indukci apoptózy. Tomuto odpovídají i naše výsledky, kdy exprese *RXRA* i *PPARGCIA* byla nižší u pacientek v pokročilejším stádiu nádoru i u nádorů vyššího histologického stupně. Působení těchto genů je obecně spojené s metabolismem lipidů a steroidních molekul a nejsou specifické pouze pro metabolismus a transport oxysterolů. Studie zaměřené na jejich roli u karcinomu prsu například ukázaly, že jejich působením dochází ke snížení exprese aromatázy, enzymu který má na svědomí syntézu estrogenu (Rubin *et al.* 2002), což opět ukazuje spíše na příznivý prognostický potenciál těchto faktorů.

Celkově lze konstatovat, že naše studie identifikovala řadu genů, jejichž exprese na úrovni mRNA se významně liší mezi ER pozitivními a ER negativními karcinomy prsu. Exprese vybraných genů dále souvisela s klinicko-patologickými daty pacientek. Obecně platí, že exprese řady z námi stanovených genů byla snižena v nádorech nižšího stádia i histologického stupně. Mezi nejzajímavějšími geny z naší studie lze zmínit *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCG2*, nebo *CH25H*. U genu *CYP7B1* jsou výsledky dosavadních studií zatím nejednoznačné. Výsledky studie však nenaznačují vztah mezi expresí většiny genů a bezpříznakovým přežíváním pacientek s ER pozitivním karcinomem prsu a tedy jejich využití jako prognostických biomarkerů se zatím nejeví reálné. Jedinou výjimku v tomto ohledu tvořil gen pro transportér *ABCG2*.

Analýza exprese čistě na úrovni mRNA je jistě jednou z limitací naší studie, která brání posouzení funkčních důsledků deregulace hladin transkriptu. Vzhledem k prognostickému vztahu jsme se pokusili prokázat expresí *ABCG2* rovněž na úrovni proteinu, avšak, přes řadu

optimalizačních kroků, se nám expresi proteinu ABCG2 ve vzorcích použitých v této studii detekovat nepodařilo. Další limitací je jistě omezený počet vzorků nádorové tkáně, na kterém byla studie provedena. Pro ověření našich výsledků by měla být provedena validační studie na větší a etnicky rozmanitější kohortě pacientek, což je proveditelné ve formátu mezinárodního konsorcia. Na druhou stranu naše studie se věnovala analýzám klinicky homogenního souboru pacientek se shodnou logistikou sběru, ukládání, zpracování vzorků i samotných analýz, což v těchto případech hraje zásadní roli pro omezení vlivu technických chyb.

Vzhledem k tomu, že diagnostickými biomarkery nemusí být pouze genová či proteinová exprese v cílové tkáni, v druhé předkládané studii byly analyzovány hladiny oxysterolů v cirkulaci pacientek se stejným onemocněním. V plasmě pacientek s ER pozitivním karcinomem prsu byly stanoveny hladiny celkem šesti oxysterolů a naměřené hodnoty byly opět porovnány s klinicko-patologickými údaji. Z těchto šesti oxysterolů jsme žádnou statisticky významnou asociaci nezjistili v případě 25-HC. Asociace 25-HC byla v minulosti studována pouze u jedné další studie karcinomu prsu, kde hladina 25-HC vyšla významně zvýšená u pacientek s metastatickým onemocněním (Dalenc *et al.* 2017). V naší studii se asociace se zasažením mízních uzlin nepotvrdila, což však může být způsobeno malým počtem porovnávaných vzorků (10 nemetastatických vs. 19 metastatických vzorků od pacientek ve studii Dalenc *et al.* a 47 pacientek s pN0 vs. 7 pacientek s pN1 nebo pN2 v případě naší analýzy).

Hladiny dalších tří oxysterolů (27-HC, 7 α -HC a β -EC) mezi sebou vzájemně korelovaly a byly statisticky signifikantně nižší u pacientek s nádory menší velikosti (v případě β -EC však pouze bez odlehlých hodnot) a také u pacientek s méně pokročilým onemocněním - stádiem (zde se při vynechání odlehlých hodnot statistická významnost ztratila u 27-HC a 7 α -HC). Vztah nižší hladiny 27-HC s menší velikostí tumorů je v souladu s literaturou, podle níž přítomnost 27-HC zvyšuje buněčnou proliferaci a stimuluje růst nádorů. Podobný efekt však není znám u 7 α -HC nebo β -EC a význam jejich asociace s velikostí a/nebo stádiem nádorů je třeba podrobněji vysvětlit v návazných studiích. U žádného z těchto tří oxysterolů jsme však nezjistili vztah k bezpříznakovému přežívání pacientek, a tedy nelze hovořit o jejich prognostickém významu. V budoucích studiích navrhujeme se zaměřit na hladiny těchto oxysterolů přímo v nádorové tkáni karcinomu prsu a ověření jejich prognostického významu. Srovnatelný výsledek byl zjištěn pro 27-HC u pacientů s glioblastomem, kde byla vyšší hladina 27-HC asociována s kratším celkovým přežíváním pacientů (Liu *et al.* 2019). Studie analyzující

hladinu 27-HC přímo v tkáních karcinomu prsu (Solheim *et al.* 2019; Wu *et al.* 2013) se však na porovnání této hladiny s klinicko-patologickými daty pacientek nezaměřily.

Jako nejvýznamnější oxysterol s potenciálním prognostickým významem se na základě naší studie jeví CT, jehož hladina významně korelovala s vyšším věkem v době diagnózy, byla nižší v plasmě pacientek s menšími nádory a nižší hladina rovněž souvisela s delším bezpříznakovým přežíváním. Tento vztah byl patrný jak v celé studované kohortě, tak ve skupině pacientek léčených pouze tamoxifenem, kde byla statistická signifikance dokonce ještě vyšší. V dostupné literatuře se jedná o první a zatím jedinou studii, která zjistila prognostický potenciál hladiny CT u pacientů s nádorovým onemocněním. Studie z roku 2017 sice analyzovala hladinu CT u pacientek s karcinomem prsu, ale nezjistila významnou asociaci mezi analyzovanými klinickými údaji (Dalenc *et al.* 2017). Další studie zatím u onkologických pacientů CT neanalyzovaly.

CT vzniká enzymaticky působením ChEH/AEBS a jeho účinek na buňky je obecně cytotoxický, vede ke zpomalení buněčné proliferace, migrace i invaze a k programované buněčné smrti, jak bylo ukázáno na modelových buněčných liniích karcinomu prostaty, či ER negativního karcinomu prsu (Levy *et al.* 2019; Lin *et al.* 2013). Vzhledem k tomu, že jsme v naší studii zjistili vztah nízkých hladin CT k lepší prognóze, tyto popsané efekty se jeví jako protichůdné a za námi zjištěným vztahem pravděpodobně nestojí. Přítomnost CT *in vitro* ale také zvyšuje počet chromozomových aberací a zvyšuje hladinu ROS (Cheng *et al.* 2005), která může dále přispívat k nádorové progresi (Liou and Storz 2010). V neposlední řadě je třeba zmínit, že z CT vzniká působením 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy 2 další oxysterol, OCDO, jehož přítomnost naopak stimuluje nádorový růst (Voisin *et al.* 2017). Hladina OCDO byla vyšší v tkáních pacientek s karcinomem prsu v porovnání s okolní nemaligní tkání (Voisin *et al.* 2017) a jeho hladina byla také vyšší v séru pacientek s metastatickým karcinomem prsu, ačkoli tento výsledek byl nad hranicí signifikance (Dalenc *et al.* 2017). Naše studie se bohužel na analýzu hladiny OCDO nezaměřila, ale v budoucích analýzách by bylo jistě vhodné jej zahrnout a zjistit, zda a případně jaký prognostický potenciál bude jeho hladina mít.

Limitací této studie je opět poměrně nízký počet vzorků plasmy, které bylo možné do studie zahrnout a bylo by jistě vhodné analýzu zopakovat na větším souboru pacientek, který by umožnil robustnější analýzu hladiny jednotlivých oxysterolů. Další limitací, která se týká obecně analýzy oxysterolů a byla diskutována již v kapitole 1.3.5, je obtížnost analýzy oxysterolů obecně vzhledem k jejich nestabilitě a tendenci k autooxidaci. Na koncentraci oxysterolů ve vzorcích plasmy tak může mít vliv, např. dlouhodobé skladování a to i při velmi nízkých teplotách. Tyto potíže se projeví zejména při porovnání výsledků různých studií i

laboratoří mezi sebou (Lütjohann *et al.* 2018). Naše studie byla provedena na velmi homogenním souboru pacientek pocházejících z jednoho nemocničního zařízení. Se všemi vzorky bylo nakládáno stejně tak, aby byla případná variabilita snížena na minimum. Další optimalizace metodiky nakládání se vzorky a stanovení hladiny jednotlivých oxysterolů je ale nutná nejen v naší laboratoři, ale na všech ostatních pracovištích. Na zlepšení těchto metodik pracuje celosvětově řada špičkových týmů specializovaných na lipidomické analýzy, např. konsorcium ENOR (<https://www.oxysterols.net/new-enor-groups>), jehož jsme členy.

Posledním cílem této dizertační práce byla analýza vlivu 7-KC na buněčné linie karcinomu prsu *in vitro*. Tento oxysterol byl vybrán na základě studie publikované naší laboratoří (Soucek *et al.* 2017), kdy byla nalezena významně vyšší hladina 7-KC u pacientek s karcinomem prsu po chirurgickém odstranění nádoru a zahájení hormonální terapie a/nebo chemoterapie ve srovnání s pacientkami před léčbou. Výzkumnou otázkou tedy bylo, jak přítomnost 7-KC ovlivní růst a charakteristiky, jako jsou změny na úrovni buněčného cyklu, exprese vybraných genů, či buněčné migrace a invazivity, buněčných linií karcinomu prsu. Dále jsme se zajímali o to jak 7-KC ovlivní cytostatické působení tamoxifenu. Soustředili jsme se na studium rozdílů mezi liniemi s expresí bez exprese ER, které tak modelují hlavní subtypy karcinomu prsu.

Zjistili jsme, že 7-KC působí na všechny tři buněčné linie cytostaticky s hodnotami IC_{50} podobnými tamoxifenu (11 – 21 μ M pro tamoxifen a 11 – 19 μ M pro 7-KC). V případě použití nízkých (subletálních) koncentrací 7-KC v kombinaci s tamoxifenem jsme potom zjistili mírné snížení účinnosti tamoxifenu v případě ER pozitivní buněčné linie MCF-7, nebo žádný vliv na účinnost tamoxifenu v případě buněčné linie T47D, která je také ER pozitivní, ale vyznačuje se vysokou specifitou k progesteronu, na který MCF-7 nereaguje. Naopak u ER negativní linie BT-20 jsme zjistili synergický účinek tamoxifenu a 7-KC a tedy nejnižší IC_{50} . Tyto výsledky byly potvrzeny také při analýze kaspázové aktivity, kdy docházelo k nejvyšší aktivaci u ER negativní linie.

Jak již bylo řečeno v kapitole 1.3.4.2, většina studií, které se zabývaly mechanismem vlivu oxysterolů na protinádorovou terapii, zjistila změny na úrovni aktivity a/nebo exprese transportéru ABCB1. V analýze genové exprese jsme se proto zaměřili na stanovení hladiny právě genu *ABCB1* a také dalšího genu souvisejícího s lékovou rezistencí - *ABCC2*. Substrátem pro protein ABCB1 jsou mimo jiné primární metabolity tamoxifenu – endoxifen a 4-hydroxytamoxifen (Iusuf *et al.* 2011; Teft *et al.* 2011). Vyšší exprese *ABCC2* je zase v literatuře spojována s rezistencí k tamoxifenu v buněčné linii MCF-7 (Choi *et al.* 2007) a jeho

polymorfismy jsou spojovány s bezpříznakovým přežíváním pacientek s karcinomem prsu léčených tamoxifenem (Kiyotani *et al.* 2010; Kiyotani *et al.* 2012). V naší studii byla však hladina *ABCB1* ve všech třech buněčných liniích extrémně nízká, zejména v ER negativní buněčné linii BT-20 se hladina blížila limitu detekce (Ct = 40). Exprese genu *ABCC2* nebyla ovlivněna přítomností 7-KC.

Mezi stanovovanými geny byly i receptory LXR α (gen *LXRA*) a LXR β (gen *LXRB*), které ovlivňují metabolismus a transport lipidů na mnoha úrovních a mimo jiné také přispívají k vyšší expresi *ABCB1* a *ABCC2* (Chisaki *et al.* 2009; ElAli and Hermann 2012). Exprese ani jednoho z těchto receptorů však nebyla za námi testovaných podmínek deregulována.

Do analýzy byl zahrnut také komplex AEBS (tvořený geny *DHCR7* a *EBP* (Kedjouar *et al.* 2004)). Tento komplex může vázat jak TAM, tak některé oxysteroly včetně 7-KC, přičemž vazba obou sloučenin způsobuje inhibici AEBS vedoucí k akumulaci sterolů v buňce, buněčné smrti a autofagii, jak bylo v minulosti prokázáno na buněčné linii MCF-7 (de Medina *et al.* 2010; de Medina *et al.* 2009). V naší studii jsme pozorovali sníženou expresi obou genů v liniích MCF-7 a BT-20 ošetřených 7-KC a v případě linie MCF-7 také u kombinace TAM+7-KC. Tyto výsledky naznačují, že 7-KC inhibuje AEBS nejen přímou vazbou na proteiny, ale také snížením jejich exprese. V případě inkubace buněk MCF-7 se samotným TAM nebyla ale pozorována žádná signifikantní deregulace v porovnání s kontrolními buňkami, inhibice AEBS musí v tomto případě tedy probíhat přímou vazbou nebo jinými mechanismy, nikoli však regulací genové exprese. U buněk T47D a BT-20 jsme zjistili zvýšenou expresi obou genů AEBS ve vzorcích ošetřených pouze TAM. V současné literatuře nebyla role TAM v aktivitě AEBS u těchto dvou buněčných linií dosud hodnocena. Zdá se tedy, že je zapotřebí dalších studií k lepšímu pochopení role TAM v regulaci AEBS, zejména u modelů ER-negativního karcinomu prsu.

Další skupinou genů, kterou jsme pro analýzu vybrali, byly geny účastníci se metabolismu tamoxifenu, které jsou shrnuty v přehledovém článku Brauch *et al.* (Brauch *et al.* 2009). Nejzajímavějším kandidátem z těchto genů byl gen *CYP1B1*, jehož exprese byla zvýšená u buněčné linie MCF-7 v případě inkubace s tamoxifenem, či kombinací tamoxifenu a 7-KC. Naopak u buněčné linie BT-20 byla exprese snížena v případě inkubace buněk s 7-KC i kombinací obou látek. *CYP1B1* katalyzuje přeměnu trans-4-hydroxytamoxifenu na méně účinný cis-4-hydroxytamoxifen (Crewe *et al.* 2002). Je vysoce exprimován u hormonálně podmíněných malignit, jako je karcinom prsu, prostaty, dělohy, či vaječníků (Gajjar *et al.* 2012). Hladina jeho exprese v těchto nádorech je vyšší v porovnání s okolní nemaligní tkání. Exprese *CYP1B1* je spojena s rezistencí k radioterapii či chemoterapii (Carrera *et al.* 2020) a

jeho inhibitory zlepšují účinnost doxorubicinu, cisplatiny, docetaxelu, či paclitaxelu (Verma *et al.* 2019). Zvýšená exprese byla zjištěna také u buněčných linií MCF-7 rezistentních vůči různým antiestrogenům (tamoxifen, ICI 182780 a ICI 164384) v porovnání se senzitivními buňkami MCF-7 (Brockdorff *et al.* 2000) a je spojená s vyšší proliferací, EMT, migrací a invazivitou u buněčných linií MCF-7 a MCF-10A (Kwon *et al.* 2016). Metylace v promotoru genu *CYP1B1* se navíc ukázala jako významný prediktor odpovědi na léčbu tamoxifinem u pacientek s karcinomem prsu (Widschwendter *et al.* 2004). Tyto výsledky a spousta dalších u ostatních nádorových onemocnění ukazují, že *CYP1B1* je skutečně významným hráčem, který může podstatně ovlivňovat chování nádorových buněk a jejich odpověď na terapii. Naše výsledky tento názor rozšiřují poznáním, že za sníženou účinnost tamoxifenu v případě linie MCF-7 může být (spolu)zodpovědná právě zvýšená exprese *CYP1B1* (prokázali jsme na hladině transkriptu i proteinu), která v tomto případě není ovlivněna přítomností 7-KC. U buněčné linie BT-20 sice nedochází ke změně exprese v přítomnosti samotného tamoxifenu, ale snížení exprese *CYP1B1* v přítomnosti 7-KC může být opět (spolu)zodpovědné za synergický efekt, který je v přítomnosti obou testovaných látek pozorován. Celkově lze tedy konstatovat, že 7-KC může skrze modulaci exprese *CYP1B1* (a možná dalších cílových genů) ovlivňovat senzitivitu/rezistenci buněk karcinomu prsu vůči tamoxifenu. Pro odhalení deregulace dalších genů a komplexní analýzu této deregulace byly ze vzorků buněčných linií připraveny knihovny pro RNA sekvenování a analýzu celého transkriptomu u všech sledovaných linií v přítomnosti 7-KC a/nebo tamoxifenu. Detailní analýza těchto výsledků bude předmětem dalších studií.

Dalším úkolem naší *in vitro* studie byla analýza vlivu 7-KC na buněčnou migraci a invazivitu. Schopnost některých oxysterolů indukovat, nebo naopak inhibovat migraci a invazi buněk byla popsána v kapitole 1.3.2. V případě 7-KC byly doposud publikovány jen práce spojující jeho přítomnost se změnami migrace buněk hladkého svalstva aorty, nebo endoteliálních buněk, kde docházelo i k EndMT. Zatím však nebyla publikována studie spojující přítomnost 7-KC s migrací jakýchkoli nádorových buněčných linií. V rámci naší studie jsme tedy poprvé popsali statisticky signifikantní zvýšení migrace v případě všech tří testovaných linií a také zvýšení invazivity buněčných linií T47D a BT-20 v přítomnosti 7-KC. 7-KC tedy, na rozdíl od jeho vlivu na účinnost tamoxifenu, stimuluje buněčnou migraci a invazivitu shodně u ER pozitivních i negativních buněčných linií karcinomu prsu. Naše studie tedy jako první ukazuje, že 7-KC může ovlivňovat i tento aspekt *in vitro*. Pokud by se prokázal podobný vliv i u pacientek, tj. zvýšené hladiny 7-KC u progredujícího onemocnění, znamenalo by to, že 7-KC je negativním prognostickým biomarkerem nádorové progresy. Účinky 7-KC

bude v budoucnu nutné ověřit také u dalších buněčných linií představujících modely jiných typů nádorových onemocnění.

Limitací předkládané *in vitro* studie je fakt, že podmínky těchto experimentů nemusejí reflektovat situaci v lidském organismu. Z tohoto důvodu by bylo žádoucí získané výsledky ověřit také v *in vivo* experimentálních modelech, doplnit další studie zahrnující vzorky od pacientek a stanovit hladinu 7-KC přímo v nádorové tkáni. V naší studii analyzující vzorky plasmu pacientek jsme hladinu 7-KC stanovovali také. Hladina 7-KC však asociovala pouze s věkem v době diagnózy a neprokázala statisticky významnou asociaci ani s bezpříznakovým přežíváním pacientek, které v rámci terapie dostávaly pouze tamoxifen, ani se zasažením mízních uzlin. Metastatické pacientky jsme nesledovali. Vzhledem k obecně příznivé prognóze pacientek s ER pozitivním karcinomem prsu se v našem souboru vyskytlo jen několik případů (n=7) se zasaženými mízními uzlinami a také pouze u několika případů došlo k relapsu onemocnění (n=9) u pacientek, které v rámci terapie dostávaly pouze tamoxifen. Možný efekt 7-KC se u tak malých skupin pacientek nemusel projevit a proto je potřeba studii provést na větším souboru.

Celkově vzato je tedy 7-KC vhodným kandidátem pro další studie, ať už *in vitro* pro analýzu dalších vlivů u buněčných linií karcinomu prsu, ale také jeho vlivu na modely jiných nádorů, případně *in vivo* studie zaměřené na validaci těchto výsledků v komplexnějších podmínkách živého organismu, a v neposlední řadě i další studie zahrnující materiál od pacientů.

6. Závěr

Předkládaná dizertační práce se zaměřila na hledání nových biomarkerů u pacientek s karcinomem prsu a to jednak mezi geny souvisejícími s metabolismem, transportem a dalším fungováním oxysterolů v buňce, i mezi samotnými oxysteroly a jejich hladinou v cirkulaci pacientek. Výsledkem těchto studií je několik kandidátních genů, jejichž exprese byla významně asociována s klinickými daty pacientek v naší práci, ale také v dalších publikovaných studiích. Asociace s bezpříznakovým přežíváním pacientek byla zjištěna v případě genu *ABCG2*. U ostatních genů bude jejich případný prognostický potenciál nutno ověřit na větším souboru pacientek. Mezi studovanými oxysteroly v plasmě pacientek se nám podařilo odhalit významný vztah mezi hladinou cholesterol-3 β , 5 α , 6 β -triolu a bezpříznakovým přežíváním pacientek. Jedná se o první a prozatím jedinou studii, která ukázala na významnou asociaci tohoto oxysterolu s prognózou pacientek s karcinomem prsu. Pro potvrzení prognostického významu cholesterol-3 β , 5 α , 6 β -triolu bude nutné výsledky ověřit na větší kohortě pacientek.

Poslední část této dizertační práce se zaměřila na *in vitro* analýzu účinků 7-ketocholesterolu v modelových buněčných liniích karcinomu prsu. Výsledkem těchto experimentů bylo zjištění rozdílného vlivu 7-ketocholesterolu na účinnost tamoxifenu u ER pozitivní a negativní buněčné linie karcinomu prsu, které může být mj. důsledkem odlišné regulace genové exprese enzymu *CYP1B1* v přítomnosti tamoxifenu a 7-ketocholesterolu v závislosti na typu buněčné linie. V neposlední řadě jsme v naší analýze jako první zjistili schopnost 7-ketocholesterolu stimulovat migraci a invazivitu nádorových buněčných linií bez ohledu na stav exprese ER.

Výstupy této dizertační práce přispěly k dalšímu porozumění, jak může přítomnost 7-ketocholesterolu ovlivňovat buňky karcinomu prsu *in vitro* a ukázaly také na další oxysterol, cholesterol-3 β , 5 α , 6 β -triol, který je kandidátem pro budoucí podrobnější *in vitro*, ale i *in vivo* analýzy jeho účinků u modelů nádorových onemocnění. Výsledky této práce jsou tak dalším střípkem ve skládačce, kterou představují velmi komplexní účinky oxysterolů u nádorových onemocnění, které se v tomto kontextu studují relativně krátkou dobu.

7. Seznam publikací

Publikace se vztahem k tématu dizertační práce:

- 1) **Kloudova, A.**, Brynychova, V., Vaclavikova, R., Vrana, D., Gatek, J., Mrhalova, M., Kodet R. and Soucek, P. (2017). Expression of oxysterol pathway genes in oestrogen-positive breast carcinomas. *Clinical Endocrinology*, 86(6), 852-861. *doi: 10.1111/cen.13337*.
Původní publikace, IF₂₀₂₁ = 3,523. *Podíl autorky 35 %*

- 2) **Kloudova, A.**, Guengerich, F. P., and Soucek, P. (2017). The role of oxysterols in human cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(7), 485-496. *doi: 10.1016/j.tem.2017.03.002*.
Přehledová publikace, IF₂₀₂₁ = 10,586. *Podíl autorky 50 %*

- 3) Holy, P., **Kloudova, A.**, and Soucek, P. (2018). Importance of genetic background of oxysterol signaling in cancer. *Biochimie*, 153, 109-138. *doi: 10.1016/j.biochi.2018.04.023*.
Přehledová publikace, IF₂₀₂₁ = 4,372. *Podíl autorky 20 %*

- 4) **Kloudova-Spalenkova, A.**, Ueng, Y. F., Wei, S., Kopeckova, K., Guengerich, F. P., & Soucek, P. (2020). Plasma oxysterol levels in luminal subtype breast cancer patients are associated with clinical data. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 197, 105566. *doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105566*.
Původní publikace, IF₂₀₂₁ = 5,011. *Podíl autorky 50 %*

- 5) **Kloudova-Spalenkova, A.**, Holy, P., & Soucek, P. (2021). Oxysterols in cancer management: From therapy to biomarkers. *British Journal of Pharmacology*, 178(16), 3235-3247. *doi: 10.1111/bph.15273*.
Přehledová publikace, IF₂₀₂₁ = 9,473. *Podíl autorky 50 %*

- 6) **Spalenkova, A.**, Ehrlichova, M., Guengerich, F.P., Wei, S., & Soucek, P.: Effects of 7-ketocholesterol on tamoxifen efficacy in breast carcinoma cell line models in vitro
Původní publikace, nepublikovaná data – přijato k publikaci v *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, IF₂₀₂₁ = 5,011
Podíl autorky 60 %

Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce:

- 7) Seborova, K., **Kloudova-Spalenkova, A.**, Koucka, K., Holy, P., Ehrlichova, M., Wang, C., Ojima I., Voleska I, Daniel P, Balusikova K, Jelinek M, Kovar J, Rob R, Hruza M, Mrhalova M, Soucek P and Vaclavikova R. (2022). The role of TRIP6, ABCC3 and CPS1 expression in resistance of ovarian cancer to taxanes. International Journal of Molecular Sciences, 23(1), 73. doi: 10.3390/ijms23010073.
Původní publikace, IF₂₀₂₁ = 6,208. Podíl autorky 10 %

- 8) Seborova, K., Koucka, K., **Spalenkova, A.**, Holy, P., Ehrlichova, M., Sychra, T., Chen L., Bendale H., Ojima I, Sandoval-Acuña C., Truksa J, Soucek P. and Vaclavikova R. (2022). Anticancer regimens containing third generation taxanes SB-T-121605 and SB-T-121606 are highly effective in resistant ovarian carcinoma model. Frontiers in Pharmacology, 13. doi: 10.3389/fphar.2022.971905.
Původní publikace, IF₂₀₂₁ = 5,988. Podíl autorky 10 %

- 9) Sychra, T., Václavíková, R., Szabó, A., **Spálenková, A.**, Šeborová, K., Balatka, Š., Tesařová T., Kočí K., Gürlich R, Souček P and Oliverius M. (2022). Introducing in vivo pancreatic cancer models for the study of new therapeutic regimens. Rozhledy v chirurgii, Winter;101(12):584-592. doi: 10.33699/PIS.2022.101.12.584-592.
Původní publikace, bez IF. Podíl autorky 10 %

8. Seznam literatury

- Ares MP, Pörn-Ares MI, Moses S *et al.* (2000) 7beta-hydroxycholesterol induces Ca(2+) oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 153:23-35
- Avena P, Casaburi I, Zavaglia L *et al.* (2022) 27-Hydroxycholesterol binds GPER and induces progression of estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancers* 14 doi:10.3390/cancers14061521
- Awad AB, Smith AJ, Fink CS (2001) Plant sterols regulate rat vascular smooth muscle cell growth and prostacyclin release in culture. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64:323-330 doi:10.1054/plf.2001.0273
- Ayala-Torres S, Moller PC, Johnson BH *et al.* (1997) Characteristics of 25-hydroxycholesterol-induced apoptosis in the human leukemic cell line. *CEM Exp Cell Res* 235:35-47 doi:10.1006/excr.1997.3630
- Ayala-Torres S, Zhou F, Thompson EB (1999) Apoptosis induced by oxysterol in CEM cells is associated with negative regulation of c-Myc. *Exp Cell Res* 246:193-202 doi:10.1006/excr.1998.4308
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 57:289-300 doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Bensinger SJ, Bradley MN, Joseph SB *et al.* (2008) LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 134:97-111 doi:10.1016/j.cell.2008.04.052
- Biasi F, Chiarpotto E, Sottero B *et al.* (2013) Evidence of cell damage induced by major components of a diet-compatible mixture of oxysterols in human colon cancer CaCo-2 cell line. *Biochimie* 95:632-640 doi:10.1016/j.biochi.2012.10.011
- Björkhem I, Diczfalusy U, Lövgren-Sandblom A *et al.* (2014) On the formation of 7-ketocholesterol from 7-dehydrocholesterol in patients with CTX and SLO. *J Lipid Res* 55:1165-1172 doi:10.1194/jlr.P048603
- Boenzi S, Deodato F, Taurisano R *et al.* (2016) Evaluation of plasma cholestane-3β,5α,6β-triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism. *J Lipid Res* 57:361-367 doi:10.1194/jlr.M061978
- Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M *et al.* (2009) Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin Chem* 55:1770-1782 doi:10.1373/clinchem.2008.121756
- Brockdorff BL, Skouv J, Reiter BE *et al.* (2000) Increased expression of cytochrome p450 1A1 and 1B1 genes in anti-estrogen-resistant human breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 88:902-906 doi:10.1002/1097-0215(20001215)88:6<902::aid-ijc10>3.0.co;2-c
- Brown AJ, Dean RT, Jessup W (1996) Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages. *J Lipid Res* 37:320-335
- Bustin SA, Benes V, Garson JA *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611-622 doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Calleros L, Sanchez-Hernandez I, Baquero P *et al.* (2009) Oncogenic Ras, but not B-V600E-RAF, protects from cholesterol depletion-induced apoptosis through the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 30:1670-1677 doi:10.1093/carcin/bgp188
- Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF *et al.* (2018) A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal* 16:11 doi:10.1186/s12964-018-0220-7
- Carrera AN, Grant MKO, Zordoky BN (2020) CYP1B1 as a therapeutic target in cardio-oncology. *Clin Sci (Lond)* 134:2897-2927 doi:10.1042/CS20200310
- Carvalho JF, Silva MM, Moreira JN *et al.* (2010) Sterols as anticancer agents: synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis. *J Med Chem* 53:7632-7638 doi:10.1021/jm1007769
- Chen L, Zhang L, Xian G *et al.* (2017) 25-Hydroxycholesterol promotes migration and invasion of lung adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 484:857-863 doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.003

- Cheng YW, Kang JJ, Shih YL *et al.* (2005) Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food Chem Toxicol* 43:617-622 doi:10.1016/j.fct.2005.01.007
- Chisaki I, Kobayashi M, Itagaki S *et al.* (2009) Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver. *Biochim Biophys Acta* 1788:2396-2403 doi:10.1016/j.bbamem.2009.08.014
- Choi HK, Yang JW, Roh SH *et al.* (2007) Induction of multidrug resistance associated protein 2 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 14:293-303 doi:10.1677/ERC-06-0016
- Chu PY, Tzeng YT, Tsui KH *et al.* (2022) Downregulation of ATP binding cassette subfamily a member 10 acts as a prognostic factor associated with immune infiltration in breast cancer. *Aging (Albany NY)* 14:2252-2267 doi:10.18632/aging.203933
- Clarion L, Schindler M, de Weille J *et al.* (2012) 7 beta-Hydroxycholesterol-induced energy stress leads to sequential opposing signaling responses and to death of c6 glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 83:37-46 doi:10.1016/j.bcp.2011.09.022
- Corcoran RB, Scott MP (2006) Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8408-8413 doi:10.1073/pnas.0602852103
- Costet P, Luo Y, Wang N *et al.* (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275:28240-28245 doi:10.1074/jbc.M003337200
- Crewe HK, Notley LM, Wunsch RM *et al.* (2002) Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos* 30:869-874 doi:10.1124/dmd.30.8.869
- Dalenc F, Iuliano L, Filleron T *et al.* (2017) Circulating oxysterol metabolites as potential new surrogate markers in patients with hormone receptor-positive breast cancer: Results of the OXYTAM study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 169:210-218 doi:10.1016/j.jsbmb.2016.06.010
- Dambal S, Alfaqih M, Sanders S *et al.* (2020) 27-Hydroxycholesterol Impairs Plasma Membrane Lipid Raft Signaling as Evidenced by Inhibition of IL6-JAK-STAT3 Signaling in Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 18:671-684 doi:10.1158/1541-7786.mcr-19-0974
- Dasari B, Prasanthi JR, Meiers C *et al.* (2013) Differential effects of the estrogen receptor agonist estradiol on toxicity induced by enzymatically-derived or autoxidation-derived oxysterols in human ARPE-19 cells. *Curr Eye Res* 38:1159-1171 doi:10.3109/02713683.2013.811257
- de Freitas FA, Levy D, Reichert CO *et al.* (2022) Effects of Oxysterols on Immune Cells and Related Diseases. *Cells* 11 doi:10.3390/cells11081251
- de Medina P, Paillasse MR, Segala G *et al.* (2010) Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13520-13525 doi:10.1073/pnas.1002922107
- de Medina P, Paillasse MR, Segala G *et al.* (2013) Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. *Nat Commun* 4:1840 doi:10.1038/ncomms2835
- de Medina P, Silvente-Poirot S, Poirot M (2009) Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy* 5:1066-1067
- Delimaris I, Faviou E, Antonakos G *et al.* (2007) Oxidized LDL, serum oxidizability and serum lipid levels in patients with breast or ovarian cancer. *Clin Biochem* 40:1129-1134 doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.06.007
- Di Gangi IM, Mazza T, Fontana A *et al.* (2016) Metabolomic profile in pancreatic cancer patients: a consensus-based approach to identify highly discriminating metabolites. *Oncotarget* 7:5815-5829 doi:10.18632/oncotarget.6808
- Diestel A, Aktas O, Hackel D *et al.* (2003) Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med* 198:1729-1740 doi:10.1084/jem.20030975

- do Nascimento RG, Otoni KM (2020) Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology* 30:e20200024.
- Dugas B, Charbonnier S, Baarine M *et al.* (2010) Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *Eur J Nutr* 49:435-446 doi:10.1007/s00394-010-0102-2
- Duran MJ, Pierre SV, Lesnik P *et al.* (2010) 7-ketocholesterol inhibits Na,K-ATPase activity by decreasing expression of its α 1-subunit and membrane fluidity in human endothelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 56 Suppl:OL1434-1441
- Eibinger G, Fauler G, Bernhart E *et al.* (2013) On the role of 25-hydroxycholesterol synthesis by glioblastoma cell lines. Implications for chemotactic monocyte recruitment. *Exp Cell Res* 319:1828-1838 doi:10.1016/j.yexcr.2013.03.025
- ElAli A, Hermann DM (2012) Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells. *Brain Pathol* 22:175-187 doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00517.x
- Elsnerova K, Mohelnikova-Duchonova B, Cerovska E *et al.* (2016) Gene expression of membrane transporters: Importance for prognosis and progression of ovarian carcinoma. *Oncol Rep* 35:2159-2170 doi:10.3892/or.2016.4599
- Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19:403-410 doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
- Escajadillo T, Wang H, Li L *et al.* (2016) Oxysterol-related-binding-protein related Protein-2 (ORP2) regulates cortisol biosynthesis and cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 427:73-85 doi:10.1016/j.mce.2016.03.006
- Feig JE, Pineda-Torra I, Sanson M *et al.* (2010) LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. *J Clin Invest* 120:4415-4424 doi:10.1172/JCI38911
- Fernandes LR, Stern ACB, Cavaglieri RD *et al.* (2017) 7-Ketocholesterol overcomes drug resistance in chronic myeloid leukemia cell lines beyond MDRI mechanism. *J Proteomics* 151:12-23 doi:10.1016/j.jprot.2016.06.011
- Flach J, Antoni I, Villemin P *et al.* (2000) The mevalonate/isoprenoid pathway inhibitor apomine (SR-45023A) is antiproliferative and induces apoptosis similar to farnesol. *Biochem Biophys Res Commun* 270:240-246 doi:10.1006/bbrc.2000.2421
- Gaffney DK, Feix JB, Schwarz HP *et al.* (1991) Cholesterol content but not plasma membrane fluidity influences the susceptibility of L1210 leukemia cells to merocyanine 540-sensitized irradiation. *Photochem Photobiol* 54:717-723 doi:10.1111/j.1751-1097.1991.tb02080.x
- Gajjar K, Martin-Hirsch PL, Martin FL (2012) CYP1B1 and hormone-induced cancer. *Cancer Lett* 324:13-30 doi:10.1016/j.canlet.2012.04.021
- Gamba P, Guglielmotto M, Testa G *et al.* (2014) Up-regulation of β -amyloidogenesis in neuron-like human cells by both 24- and 27-hydroxycholesterol: protective effect of N-acetyl-cysteine. *Aging Cell* 13:561-572 doi:10.1111/acer.12206
- Garolla A, Šabović I, Tescari S *et al.* (2018) Impaired sperm function in infertile men relies on the membrane sterol pattern. *Andrology* 6:325-334 doi:10.1111/andr.12468
- Germano A, Rossin D, Leoni V *et al.* (2020) Involvement of 27-hydroxycholesterol in mitotane action on adrenocortical carcinoma. *Cells* 9 doi:10.3390/cells9040885
- Gibson DA, Collins F, Cousins FL *et al.* (2018) The impact of 27-hydroxycholesterol on endometrial cancer proliferation. *Endocr Relat Cancer* 25:381-391 doi:10.1530/erc-17-0449
- Girao H, Pereira P, Ramalho J *et al.* (2003) Cholesterol oxides mediated changes in cytoskeletal organisation involves Rho GTPases. *Exp Cell Res* 291:502-513 doi:10.1016/j.yexcr.2003.08.002
- Girão H, Mota MC, Ramalho J *et al.* (1998) Cholesterol oxides accumulate in human cataracts. *Exp Eye Res* 66:645-652 doi:10.1006/exer.1998.0465

- Guo F, Hong W, Yang M *et al.* (2018) Upregulation of 24(R/S),25-epoxycholesterol and 27-hydroxycholesterol suppresses the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 504:892-898 doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.058
- Hajeyah AA, Griffiths WJ, Wang Y *et al.* (2020) The Biosynthesis of enzymatically oxidized lipids. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11:591819 doi:10.3389/fendo.2020.591819
- He S, Nelson ER (2017) 27-Hydroxycholesterol, an endogenous selective estrogen receptor modulator. *Maturitas* 104:29-35 doi:10.1016/j.maturitas.2017.07.014
- He SS, Ma LQ, Baek AE *et al.* (2019) Host CYP27A1 expression is essential for ovarian cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 26:659-675 doi:10.1530/erc-18-0572
- He TC, Tao BR, Yi CH *et al.* (2022) 27-Hydroxycholesterol promotes metastasis by SULT2A1-dependent alteration in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 113:2575-2589 doi:10.1111/cas.15435
- Heiduschka G, Erovic BM, Vormittag L *et al.* (2009) 7 beta-hydroxycholesterol induces apoptosis and regulates cyclooxygenase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch otorhinolaryngol - head neck surg* 135:261-267 doi:10.1001/archoto.2008.558
- Helmschrodt C, Becker S, Schroter J *et al.* (2013) Fast LC-MS/MS analysis of free oxysterols derived from reactive oxygen species in human plasma and carotid plaque. *Clinica Chimica Acta* 425:3-8 doi:10.1016/j.cca.2013.06.022
- Hiramitsu S, Ishikawa T, Lee WR *et al.* (2018) Estrogen receptor beta-mediated modulation of lung cancer cell proliferation by 27-hydroxycholesterol. *Front Endocrinol* 9 doi:10.3389/fendo.2018.00470
- Hlaváč V, Brynychová V, Václavíková R *et al.* (2013) The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* 14:515-529 doi:10.2217/pgs.13.26
- Holý P, Hlaváč V, Ostašov P *et al.* (2022) Germline and somatic genetic variability of oxysterol-related genes in breast cancer patients with early disease of the luminal subtype. *Biochimie* 199:158-169 doi:10.1016/j.biochi.2022.04.015
- Honda K, Matoba T, Antoku Y *et al.* (2018) Lipid-lowering therapy with ezetimibe decreases spontaneous atherothrombotic occlusions in a rabbit model of plaque erosion: A role of serum oxysterols. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 38:757-771 doi:10.1161/atvbaha.117.310244
- Hozoji M, Munchira Y, Ikeda Y *et al.* (2008) Direct interaction of nuclear liver X receptor-beta with ABCA1 modulates cholesterol efflux. *J Biol Chem* 283:30057-30063 doi:10.1074/jbc.M804599200
- Huang YW, Jansen RA, Fabbri E *et al.* (2009) Identification of candidate epigenetic biomarkers for ovarian cancer detection. *Oncol Rep* 22:853-861 doi:10.3892/or_00000509
- Hutchinson SA, Websdale A, Cioccoloni G *et al.* (2021) Liver x receptor alpha drives chemoresistance in response to side-chain hydroxycholesterols in triple negative breast cancer. *Oncogene* 40:2872-2883 doi:10.1038/s41388-021-01720-w
- Hwang P, Matin A (1989) Interactions of sterols with antiestrogen-binding sites - structural requirements for high-affinity binding. *J Lipid Res* 30:239-245
- Hwang PL (1992) Inhibitors of protein and RNA synthesis block the cytotoxic effects of oxygenated sterols. *Biochim Biophys Acta* 1136:5-11 doi:10.1016/0167-4889(92)90077-o
- Hyun JW, Holl V, Weltin D *et al.* (2002) Effects of combinations of 7beta-hydroxycholesterol and anticancer drugs or ionizing radiation on the proliferation of cultured tumor cells. *Anticancer Res* 22:943-948
- Ikonen E (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:125-138 doi:10.1038/nrm2336
- Indaram M, Ma WX, Zhao L *et al.* (2015) 7-Ketocholesterol increases retinal microglial migration, activation, and angiogenicity: A potential pathogenic mechanism underlying age-related macular degeneration. *Sci Rep* 5 doi:10.1038/srep09144
- Iuliano L, Micheletta F, Natoli S *et al.* (2003) Measurement of oxysterols and alpha-tocopherol in plasma and tissue samples as indices of oxidant stress status. *Anal Biochem* 312:217-223
- Iusuf D, Teunissen SF, Wagenaar E *et al.* (2011) P-glycoprotein (ABCB1) transports the primary active tamoxifen metabolites endoxifen and 4-hydroxytamoxifen and restricts their brain penetration. *J Pharmacol Exp Ther* 337:710-717 doi:10.1124/jpet.110.178301

- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR *et al.* (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383:728-731 *doi:10.1038/383728a0*
- Jaworski CJ, Moreira E, Li A *et al.* (2001) A family of 12 human genes containing oxysterol-binding domains. *Genomics* 78:185-196 *doi:10.1006/geno.2001.6663*
- Ji FB, Zhang JJ, Liu NY *et al.* (2022) Blocking hepatocarcinogenesis by a cytochrome P450 family member with female-preferential expression. *Gut* 71:2313-2324 *doi:10.1136/gutjnl-2021-326050*
- Jiao KL, Zhen J, Wu MX *et al.* (2020) 27-Hydroxycholesterol-induced EndMT acts via STAT3 signaling to promote breast cancer cell migration by altering the tumor microenvironment. *Cancer Biol Med* 17:88+ *doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0262*
- Kamiya S, Nakamori Y, Takasawa A *et al.* (2023) Vitamin D metabolism in cancer: potential feasibility of vitamin D metabolism blocking therapy. *Med Mol Morphol* *doi:10.1007/s00795-023-00348-x*
- Kedjouar B, de Médina P, Oulad-Abdelghani M *et al.* (2004) Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J Biol Chem* 279:34048-34061 *doi:10.1074/jbc.M405230200*
- Kelley RI, Hennekam RC (2000) The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* 37:321-335 *doi:10.1136/jmg.37.5.321*
- Kerr ID, Haider AJ, Gelissen IC (2011) The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty. *Br J Pharmacol* 164:1767-1779 *doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01177.x*
- Kha HT, Basseri B, Shouhed D *et al.* (2004) Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat. *J Bone Miner Res* 19:830-840 *doi:10.1359/JBMR.040115*
- Khenjanta C, Thanan R, Jusakul A *et al.* (2014) Association of CYP39A1, RUNX2 and oxidized alpha-1 antitrypsin expression in relation to cholangiocarcinoma progression. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:10187-10192 *doi:10.7314/apjcp.2014.15.23.10187*
- Kim BY, Son Y, Eo SK *et al.* (2016) Diclofenac inhibits 27-hydroxycholesterol-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 478:1456-1461 *doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.145*
- Kim JS, Lim H, Seo JY *et al.* (2022) GPR183 regulates 7alpha,25-dihydroxycholesterol-induced oxiaoptophagy in L929 mouse fibroblast cell. *Molecules* 27 *doi:10.3390/molecules27154798*
- Kim SM, Kim BY, Lee SA *et al.* (2014) 27-Hydroxycholesterol and 7alpha-hydroxycholesterol trigger a sequence of events leading to migration of CCR5-expressing Th1 lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 274:462-470 *doi:10.1016/j.taap.2013.12.007*
- Kim SM, Kim BY, Son Y *et al.* (2015) 7 alpha-hydroxycholesterol induces inflammation by enhancing production of chemokine (C-C motif) ligand 2. *Biochem Biophys Res Commun* 467:879-884 *doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.050*
- Kimbung S, Chang CY, Bendahl PO *et al.* (2017) Impact of 27-hydroxylase (CYP27A1) and 27-hydroxycholesterol in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 24:339-349 *doi:10.1530/ERC-16-0533*
- Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK *et al.* (2010) Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *J Clin Oncol* 28:1287-1293 *doi:10.1200/JCO.2009.25.7246*
- Kiyotani K, Mushiroda T, Tsunoda T *et al.* (2012) A genome-wide association study identifies locus at 10q22 associated with clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients in Japanese. *Hum Mol Genet* 21:1665-1672 *doi:10.1093/hmg/ddr597*
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P *et al.* (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4:151-175 *doi:10.4161/autophagy.5338*
- Kloudova A, Guengerich FP, Soucek P (2017) The role of oxysterols in human cancer. *Trends Endocrinol Metab* 28:485-496 *doi:10.1016/j.tem.2017.03.002*
- Kloudova-Spalenkova A, Holy P, Soucek P (2021) Oxysterols in cancer management: From therapy to biomarkers. *Br J Pharmacol* 178:3235-3247 *doi:10.1111/bph.15273*
- Kloudova-Spalenkova A, Ueng YF, Wei S *et al.* (2020) Plasma oxysterol levels in luminal subtype breast cancer patients are associated with clinical data. *J Steroid Biochem Mol Biol* 197:105566 *doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105566*

- Kukal S, Guin D, Rawat C *et al.* (2021) Multidrug efflux transporter ABCG2: expression and regulation. *Cell Mol Life Sci* 78:6887-6939 doi:10.1007/s00018-021-03901-y
- Kupferberg A, Cremel G, Behr P *et al.* (1991) Differential sensitivity of astrocyte primary cultures and derived spontaneous transformed cell lines to 7beta-hydroxycholesterol: effect on plasma membrane lipid composition and fluidity, and on cell surface protein expression. *Mol Cell Biochem* 101:11-22
- Kwon YJ, Baek HS, Ye DJ *et al.* (2016) CYP1B1 enhances cell proliferation and metastasis through induction of EMT and activation of Wnt/ β -Catenin signaling via Sp1 upregulation. *PLoS One* 11:e0151598 doi:10.1371/journal.pone.0151598
- Lanterni C, Musumeci A, Raccosta L *et al.* (2016) The administration of drugs inhibiting cholesterol/oxysterol synthesis is safe and increases the efficacy of immunotherapeutic regimens in tumor-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother* 65:1303-1315 doi:10.1007/s00262-016-1884-8
- Lappano R, Recchia AG, De Francesco EM *et al.* (2011) The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor α -mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes. *PLoS One* 6:e16631 doi:10.1371/journal.pone.0016631
- Larsson O, Blegen H (1993) Regulatory role of mevalonate in the growth of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. *Anticancer Res* 13:1075-1079
- Le Cornet C, Johnson TS, Lu DL *et al.* (2020) Association between lifestyle, dietary, reproductive, and anthropometric factors and circulating 27-hydroxycholesterol in EPIC-Heidelberg. *Cancer Causes Control* 31:181-192 doi:10.1007/s10552-019-01259-y
- Lehto M, Olkkonen VM (2003) The OSBP-related proteins: a novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signalling. *Biochim Biophys Acta* 1631:1-11 doi:10.1016/s1388-1981(02)00364-5
- Lei JT, Anurag M, Haricharan S *et al.* (2019) Endocrine therapy resistance: new insights. *Breast* 48 Suppl 1:S26-S30 doi:10.1016/S0960-9776(19)31118-X
- Leoni V, Caccia C (2011) Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids* 164:515-524 doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.04.002
- Levy D, de Melo TC, Oliveira BA *et al.* (2019) 7-Ketocholesterol and cholestane-triol increase expression of SMO and LXR alpha signaling pathways in a human breast cancer cell line. *Bioche Biophys Rep* 19 doi:10.1016/j.bbrep.2018.12.008
- Levy D, Ruiz JLM, Celestino AT *et al.* (2014) Short-term effects of 7-ketocholesterol on human adipose tissue mesenchymal stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 446:720-725 doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.132
- Li JW, Zheng XT, Lou N *et al.* (2016) Oxysterol binding protein-related protein 8 mediates the cytotoxicity of 25-hydroxycholesterol. *J Lipid Res* 57:1845-1853 doi:10.1194/jlr.M069906
- Li XK, Chen HC, Zhang LZ *et al.* (2022) 27-hydroxycholesterol linked high cholesterol diet to lung adenocarcinoma metastasis. *Oncogene* 41:2685-2695 doi:10.1038/s41388-022-02285-y
- Liang ZJ, Chen YB, Wang LP *et al.* (2019) CYP27A1 inhibits bladder cancer cells proliferation by regulating cholesterol homeostasis. *Cell Cycle* 18:34-45 doi:10.1080/15384101.2018.1558868
- Liang ZJ, Jiao W, Wang LP *et al.* (2022) CYP27A1 inhibits proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma via activation of LXRs/ABCA.1 *Exp Cell Res* 419 doi:10.1016/j.yexcr.2022.113279
- Liao PL, Cheng YW, Li CH *et al.* (2010) 7-Ketocholesterol and cholesterol-5 alpha,6 alpha-epoxide induce smooth muscle cell migration and proliferation through the epidermal growth factor receptor/phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways. *Toxico Lett* 197:88-96 doi:10.1016/j.toxlet.2010.05.002
- Lim HK, Kang HK, Yoo ES *et al.* (2003) Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G(2)/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. *Life Sci* 72:1389-1399 doi:10.1016/s0024-3205(02)02377-9
- Lin CY, Huo C, Kuo LK *et al.* (2013) Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol suppresses proliferation, migration, and invasion of human prostate cancer cells. *PLoS One* 8:e65734 doi:10.1371/journal.pone.0065734

- Lin L, Hwang PL (1991) Antiproliferative effects of oxygenated sterols: positive correlation with binding affinities for the antiestrogen-binding sites. *Biochim Biophys Acta* 1082:177-184 doi:10.1016/0005-2760(91)90192-k
- Lin S-L, Yan L-Y, Zhang X-T *et al.* (2010) ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS one* 5:e9013-e9013 doi:10.1371/journal.pone.0009013
- Linseisen J, Wolfram G, Miller AB (2002) Plasma 7beta-hydroxycholesterol as a possible predictor of lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1630-1637
- Liou GY, Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 44:479-496 doi:10.3109/10715761003667554
- Liu JA, Liu Y, Chen J *et al.* (2017) The ROS-mediated activation of IL-6/STAT3 signaling pathway is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced cellular senescence in nerve cells. *Toxicol In Vitro* 45:10-18 doi:10.1016/j.tiv.2017.07.013
- Liu L, Li MY, Xing Y *et al.* (2019) The oncogenic roles of 27-hydroxycholesterol in glioblastoma. *Oncol Lett* 18:3623-3629 doi:10.3892/ol.2019.10690
- Lordan S, O'Neill C, O'Brien NM (2008) Effects of apigenin, lycopene and astaxanthin on 7 beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis and Akt phosphorylation in U937 cells. *Br J Nutr* 100:287-296 doi:10.1017/S0007114507898643
- Lu DL, Le Cornet C, Sookthai D *et al.* (2019) Circulating 27-Hydroxycholesterol and Breast Cancer Risk: Results From the EPIC-Heidelberg Cohort. *J Natl Cancer Inst* 111:365-371 doi:10.1093/jnci/djy115
- Lyons NM, Woods JA, O'Brien NM (2001) alpha-Tocopherol, but not gamma-tocopherol inhibits 7 beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis in human U937 cells. *Free Radic Res* 35:329-339 doi:10.1080/10715760100300861
- Lyu C, Wang L, Stadlbauer B *et al.* (2022) A Pan-Cancer Landscape of ABCG2 across Human Cancers: Friend or Foe? *Int J Mol Sci* 23 doi:10.3390/ijms232415955
- Lütjohann D, Björkhem I, Friedrichs S *et al.* (2018) International descriptive and interventional survey for oxysterol determination by gas- and liquid-chromatographic methods. *Biochimie* 153:26-32 doi:10.1016/j.biochi.2018.07.016
- Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G *et al.* (1996) Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9799-9804
- Ma LM, Liang ZR, Zhou KR *et al.* (2016) 27-Hydroxycholesterol increases Myc protein stability via suppressing PP2A, SCP1 and FBW7 transcription in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 480:328-333 doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.038
- Maltese WA, Reitz BA, Volpe JJ (1981) Selective decrease of the viability and the sterol content of proliferating versus quiescent glioma-cells exposed to 25-hydroxycholesterol. *Cancer Res* 41:3448-3452
- Mashat RM, Zielinska HA, Holly JMP *et al.* (2021) A Role for ER-beta in the effects of low-density lipoprotein cholesterol and 27-hydroxycholesterol on breast cancer progression: Involvement of the IGF signalling pathway? *Cells* 11 doi:10.3390/cells11010094
- Massey JB, Pownall HJ (2005) Role of oxysterol structure on the microdomain-induced microsolvubilization of phospholipid membranes by apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 44:14376-14384 doi:10.1021/bi051169y
- McBrearty N, Cho CSA, Chen JY *et al.* (2023) Tumor-suppressive and immune-stimulating roles of cholesterol 25-hydroxylase in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res* 21:228-239 doi:10.1158/1541-7786.mcr-22-0602
- Menéndez-Carreño M, Varo N, Mugueta C *et al.* (2011) Correlation between serum content of the main COPs (cholesterol oxidation products) from autoxidation and cardiovascular risk factors. *Nutr Hosp* 26:144-151
- Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S *et al.* (2002) Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. *Biochem Pharmacol* 64:527-541 doi:10.1016/s0006-2952(02)01110-3

- Mittempergher L, Saghatchian M, Wolf DM *et al.* (2013) A gene signature for late distant metastasis in breast cancer identifies a potential mechanism of late recurrences. *Mol Oncol* 7:987-999 doi:10.1016/j.molonc.2013.07.006
- Mo W, Zhang JT (2012) Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol* 3:1-27
- Monzel JV, Budde T, Meyer Zu Schwabedissen HE *et al.* (2017) Doxorubicin enhances oxysterol levels resulting in a LXR-mediated upregulation of cardiac cholesterol transporters. *Biochem Pharmacol* 144:108-119 doi:10.1016/j.bcp.2017.08.008
- Nelson ER (2018) The significance of cholesterol and its metabolite, 27-hydroxycholesterol in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 466:73-80 doi:10.1016/j.mce.2017.09.021
- Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS *et al.* (2013a) 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science* 342:1094-1098 doi:10.1126/science.1241908
- Nelson ER, Wardell SE, McDonnell DP (2013b) The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs and oxysterols: Implications for the treatment and prevention of osteoporosis. *Bone* 53:42-50 doi:10.1016/j.bone.2012.11.011
- Nury T, Samadi M, Varin A *et al.* (2013) Biological activities of the LXR α and β agonist, 4 β -hydroxycholesterol, and of its isomer, 4 α -hydroxycholesterol, on oligodendrocytes: effects on cell growth and viability, oxidative and inflammatory status. *Biochimie* 95:518-530 doi:10.1016/j.biochi.2012.11.013
- Nury T, Zarrouk A, Mackrill JJ *et al.* (2015) Induction of oxiaoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7 beta-hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol: Protective effects of alpha-tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids* 99:194-203 doi:10.1016/j.steroids.2015.02.003
- Nury T, Zarrouk A, Vejux A *et al.* (2014) Induction of oxiaoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: Impairment by alpha-tocopherol. *Biochem Biophys Res Commun* 446:714-719 doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.081
- Nury T, Zarrouk A, Yammine A *et al.* (2021) Oxiaoptophagy: A type of cell death induced by some oxysterols. *Br J Pharmacol* 178:3115-3123 doi:10.1111/bph.15173
- Ory DS (2000) Niemann-Pick type C: a disorder of cellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1529:331-339
- Oyama T, Miyashita Y, Kinoshita K *et al.* (2002) Effect of deposited lipids in atheromatous lesions on the migration of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb* 9:109-113 doi:10.5551/jat.9.109
- Passarelli MN, McDonald JG, Thompson BM *et al.* (2022) Association of demographic and health characteristics with circulating oxysterol concentrations. *J Clin Lipidol* 16:345-355 doi:10.1016/j.jacl.2022.03.012
- Peng SK, Hill JC, Morin RJ *et al.* (1985) Influence of cholesterol oxidation derivatives on membrane bound enzymes in cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 180:126-132 doi:10.3181/00379727-180-42153
- Piehler A, Kaminski WE, Wenzel JJ *et al.* (2002) Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochem Biophys Res Commun* 295:408-416 doi:10.1016/s0006-291x(02)00659-9
- Poirot M, Silvente-Poirot S (2018) The tumor-suppressor cholesterol metabolite, dendrogenin A, is a new class of LXR modulator activating lethal autophagy in cancers. *Biochem Pharmacol* 153:75-81 doi:10.1016/j.bcp.2018.01.046
- Porter FD, Scherrer DE, Lanier MH *et al.* (2010) Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Sci Transl Med* 2:56ra81 doi:10.1126/scitranslmed.3001417
- Raccosta L, Fontana R, Maggioni D *et al.* (2013a) The oxysterol-CXCR2 axis plays a key role in the recruitment of tumor-promoting neutrophils. *J Exp Med* 210:1711-1728 doi:10.1084/jem.20130440
- Raccosta L, Fontana R, Traversari C *et al.* (2013b) Oxysterols recruit tumor-supporting neutrophils within the tumor microenvironment: The many facets of tumor-derived oxysterols. *Oncoimmunology* 2:e26469 doi:10.4161/onci.26469

- Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ *et al.* (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6511-6518 doi:10.1073/pnas.0700899104
- Raza S, Meyer M, Goodyear C *et al.* (2017) The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol stimulates cell proliferation via ER beta in prostate cancer cells. *Cancer Cell Int* 17 doi:10.1186/s12935-017-0422-x
- Raza S, Meyer M, Schommer J *et al.* (2016) 27-Hydroxycholesterol stimulates cell proliferation and resistance to docetaxel-induced apoptosis in prostate epithelial cells. *Med Oncol* 33 doi:10.1007/s12032-015-0725-5
- Raza S, Ohm JE, Dhasarathy A *et al.* (2015) The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol regulates p53 activity and increases cell proliferation via MDM2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 410:187-195 doi:10.1007/s11010-015-2551-7
- Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C *et al.* (2002) Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277:18793-18800 doi:10.1074/jbc.M109927200
- Revilla G, Pons MD, Baila-Rueda L *et al.* (2019) Cholesterol and 27-hydroxycholesterol promote thyroid carcinoma aggressiveness. *Sci Rep* 9 doi:10.1038/s41598-019-46727-2
- Rimner A, Al Makdessi S, Sweidan H *et al.* (2005) Relevance and mechanism of oxysterol stereospecificity in coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* 38:535-544 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.016
- Rodriguez IR, Alam S, Lee JW (2004) Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein in cultured RPE cells is dependent on the formation of 7-ketocholesterol. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2830-2837 doi:10.1167/iovs.04-0075
- Romanelli RJ, Mahajan KR, Fulmer CG *et al.* (2009) Insulin-Like Growth Factor-I-Stimulated Akt Phosphorylation and Oligodendrocyte Progenitor Cell Survival Require Cholesterol-Enriched Membranes. *J Neurosci Res* 87:3369-3377 doi:10.1002/jnr.22099
- Rooney M, Tamura-Lis W, Lis LJ *et al.* (1986) The influence of oxygenated sterol compounds on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer structure and packing. *Chem Phys Lipids* 41:81-92 doi:10.1016/0009-3084(86)90126-x
- Rossin D, Dias IHK, Solej M *et al.* (2019) Increased production of 27-hydroxycholesterol in human colorectal cancer advanced stage: Possible contribution to cancer cell survival and infiltration. *Free Radic Biol Med* 136:35-44 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.020
- Roussi S, Gossé F, Aoudé-Werner D *et al.* (2007) Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7beta-hydroxysitosterol and 7beta-hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis* 12:87-96 doi:10.1007/s10495-006-0485-y
- Roussi S, Winter A, Gosse F *et al.* (2005) Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of 7 beta-hydroxysitosterol and 7 beta-hydroxycholesterol in human colon cancer cells. *Cell Death Differ* 12:128-135 doi:10.1038/sj.cdd.4401530
- Rubin GL, Duong JH, Clyne CD *et al.* (2002) Ligands for the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor inhibit aromatase cytochrome P450 (CYP19) expression mediated by promoter II in human breast adipose. *Endocrinology* 143:2863-2871 doi:10.1210/endo.143.8.8932
- Rusiñol AE, Thewke D, Liu J *et al.* (2004) AKT/protein kinase B regulation of BCL family members during oxysterol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279:1392-1399 doi:10.1074/jbc.M308619200
- Ryan L, O'Callaghan YC, O'Brien NM (2005) The role of the mitochondria in apoptosis induced by 7beta-hydroxycholesterol and cholesterol-5beta,6beta-epoxide. *Br J Nutr* 94:519-525 doi:10.1079/bjn20051524
- Saito H, Kitame F, Uemura Y *et al.* (1983) The regulating effect of cholesterol derivatives isolated from human sera on lymphocyte response to phytohemagglutinin. *Tohoku J Exp Med* 140:245-258 doi:10.1620/tjem.140.245
- Salonen JT, Nyyssönen K, Salonen R *et al.* (1997) Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation* 95:840-845 doi:10.1161/01.cir.95.4.840
- Samadi A, Gurlek A, Sendur SN *et al.* (2019) Oxysterol species: reliable markers of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 42:7-17 doi:10.1007/s40618-018-0873-5

- Sato Y, Ishihara N, Nagayama D *et al.* (2017) 7-ketocholesterol induces apoptosis of MC3T3-E1 cells associated with reactive oxygen species generation, endoplasmic reticulum stress and caspase-3/7 dependent pathway. *Mol Genet Metab Rep* 10:56-60 doi:10.1016/j.ymgmr.2017.01.006
- Sbiera S, Leich E, Liebisch G *et al.* (2015) Mitotane inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 triggering lipid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis in adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology* 156:3895-3908 doi:10.1210/en.2015-1367
- Segala G, de Medina P, Iuliano L *et al.* (2013) 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of tamoxifen in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 86:175-189 doi:10.1016/j.bcp.2013.02.031
- Serhan N, Mouchel PL, Medina P *et al.* (2020) Dendrogenin A synergizes with cytarabine to kill acute myeloid leukemia cells in vitro and in vivo. *Cancers (Basel)* 12 doi:10.3390/cancers12071725
- Sever N, Song BL, Yabe D *et al.* (2003a) Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem* 278:52479-52490 doi:10.1074/jbc.M310053200
- Sever N, Yang T, Brown MS *et al.* (2003b) Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell* 11:25-33
- Shen ZX, Zhu DM, Liu J *et al.* (2017) 27-Hydroxycholesterol induces invasion and migration of breast cancer cells by increasing MMP9 and generating EMT through activation of STAT-3. *Environ Toxicol Pharmacol* 51:1-8 doi:10.1016/j.etap.2017.02.001
- Shi SZ, Lee EJ, Lin YJ *et al.* (2019) Recruitment of monocytes and epigenetic silencing of intratumoral CYP7B1 primarily contribute to the accumulation of 27-hydroxycholesterol in breast cancer. *Am J Cancer Res* 9:2194-2208
- Shimizu M, Moriwaki H (2008) Synergistic Effects of PPAR gamma ligands and retinoids in cancer treatment. *PPAR Research* 2008:181047 doi:10.1155/2008/181047
- Shu H, Yuan B, Huang Y *et al.* (2021) High expression of ABCG2 is associated with chemotherapy resistance of osteosarcoma. *J Orthop Surg Res* 16:85 doi:10.1186/s13018-021-02204-z
- Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C (2011) TNM Klasifikace zhoubných novotvarů. 7. vydání. Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, Praha. ISBN: 978-80-904259-6-5
- Solheim S, Hutchinson SA, Lundanes E *et al.* (2019) Fast liquid chromatography-mass spectrometry reveals side chain oxysterol heterogeneity in breast cancer tumour samples. *J Steroid Biochem Mol Biol* 192:105309 doi:10.1016/j.jsbmb.2019.02.004
- Soncini M, Corna G, Moresco M *et al.* (2016) 24-Hydroxycholesterol participates in pancreatic neuroendocrine tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E6219-E6227 doi:10.1073/pnas.1613332113
- Song BL, DeBose-Boyd RA (2004) Ubiquitination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in permeabilized cells mediated by cytosolic E1 and a putative membrane-bound ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 279:28798-28806 doi:10.1074/jbc.M402442200
- Song J, Wang D, Chen H *et al.* (2017) Association of plasma 7-ketocholesterol with cardiovascular outcomes and total mortality in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 120:1622-1631 doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311049
- Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalová I *et al.* (2005) Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 23:1417-1422 doi:10.1634/stemcells.2005-0066
- Soucek P, Martin MV, Ueng YF *et al.* (1995) Identification of a common cytochrome P450 epitope near the conserved heme-binding peptide with antibodies raised against recombinant cytochrome P450 family 2 proteins. *Biochemistry* 34:16013-16021 doi:10.1021/bi00049a015
- Soucek P, Vrana D, Ueng YF *et al.* (2017) Selective changes in cholesterol metabolite levels in plasma of breast cancer patients after tumor removal. *Clin Chem Lab Med* doi:10.1515/cclm-2017-0409
- Stappenbeck F, Wang F, Tang LY *et al.* (2019) Inhibition of non-small cell lung cancer cells by Oxy210, an oxysterol-derivative that antagonizes TGF beta and Hedgehog signaling. *Cells* 8 doi:10.3390/cells8101297
- Steffensen K, Gustafsson J (2006) Liver X receptors: new drug targets to treat Type 2 diabetes? *Future Lipidol* 1:181-189 doi:10.2217/17460875.1.2.181

- Sumantran VN, Mishra P, Bera R *et al.* (2016) Microarray analysis of differentially-expressed genes encoding CYP450 and phase II drug metabolizing enzymes in psoriasis and melanoma. *Pharmaceutics* 8 doi:10.3390/pharmaceutics8010004
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL *et al.* (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 71:209-249 doi:10.3322/caac.21660
- Takada I, Miyazaki T, Goto Y *et al.* (2022) Involvement of 27-hydroxycholesterol on the progression of non-small cell lung cancer via the estrogen receptor. *Am J Cancer Res* 12:4241-4253
- Tanaka AR, Noguchi K, Fukazawa H *et al.* (2013) p38MAPK and Rho-dependent kinase are involved in anoikis induced by anicequol or 25-hydroxycholesterol in DLD-1 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430:1240-1245 doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.067
- Teft WA, Mansell SE, Kim RB (2011) Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). *Drug Metab Dispos* 39:558-562 doi:10.1124/dmd.110.036160
- Telbisz Á, Özvegy-Laczka C, Hegedüs T *et al.* (2013) Effects of the lipid environment, cholesterol and bile acids on the function of the purified and reconstituted human ABCG2 protein. *Biochem J* 450:387-395 doi:10.1042/BJ20121485
- Theunissen JJ, Jackson RL, Kempen HJ *et al.* (1986) Membrane properties of oxysterols. Interfacial orientation, influence on membrane permeability and redistribution between membranes. *Biochim Biophys Acta* 860:66-74 doi:10.1016/0005-2736(86)90499-2
- Tian W, Pang WX, Ge Y *et al.* (2018) Hepatocyte-generated 27-hydroxycholesterol promotes the growth of melanoma by activation of estrogen receptor alpha. *J Cell Biochem* 119:2929-2938 doi:10.1002/jcb.26498
- Torres CG, Ramirez ME, Cruz P *et al.* (2011) 27-Hydroxycholesterol induces the transition of MCF7 cells into a mesenchymal phenotype. *Oncol Rep* 26:389-397 doi:10.3892/or.2011.1284
- Traversari C, Sozzani S, Steffensen KR *et al.* (2014) LXR-dependent and -independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth. *Eur J Immunol* 44:1896-1903 doi:10.1002/eji.201344292
- Trousson A, Bernard S, Petit PX *et al.* (2009) 25-hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J Neurochem* 109:945-958 doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06009.x
- Uchikawa T, Matoba T, Kawahara T *et al.* (2022) Dietary 7-ketocholesterol exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice through monocyte/macrophage-mediated inflammation. *Sci Rep* 12:14902 doi:10.1038/s41598-022-19065-z
- Uddin MN, Wang X (2022) Identification of key tumor stroma-associated transcriptional signatures correlated with survival prognosis and tumor progression in breast cancer. *Breast Cancer* 29:541-561 doi:10.1007/s12282-022-01332-6
- Umetani M, Domoto H, Gormley AK *et al.* (2007) 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen *Nat Med* 13:1185-1192 doi:10.1038/nm1641
- Umetani M, Ghosh P, Ishikawa T *et al.* (2014) The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol promotes atherosclerosis via proinflammatory processes mediated by estrogen receptor alpha. *Cell Metab* 20:172-182 doi:10.1016/j.cmet.2014.05.013
- Vaya J, Szuchman A, Tavori H *et al.* (2011) Oxysterols formation as a reflection of biochemical pathways: summary of in vitro and in vivo studies. *Chem Phys Lipids* 164:438-442 doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.03.005
- Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB *et al.* (2000) Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12097-12102 doi:10.1073/pnas.200367697
- Verma H, Singh Bahia M, Choudhary S *et al.* (2019) Drug metabolizing enzymes-associated chemo resistance and strategies to overcome it. *Drug Metab Rev* 51:196-223 doi:10.1080/03602532.2019.1632886
- Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D *et al.* (2010) Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 16:98-105 doi:10.1038/nm.2074

- Voisin M, de Medina P, Mallinger A *et al.* (2017) Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E9346-E9355 *doi:10.1073/pnas.1707965114*
- Wang C, He H, Fang W (2020a) Oncogenic roles of the cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol in bladder cancer. *Oncol Lett* 19:3671-3676 *doi:10.3892/ol.2020.11475*
- Wang CW, Huang CC, Chou PH *et al.* (2017a) 7-ketocholesterol and 27-hydroxycholesterol decreased doxorubicin sensitivity in breast cancer cells: estrogenic activity and mTOR pathway. *Oncotarget* 8:66033-66050 *doi:10.18632/oncotarget.19789*
- Wang F, Stappenbeck F, Matsui W *et al.* (2017b) Inhibition of pancreatic cancer cell-induced paracrine Hedgehog signaling by liver X receptor agonists and Oxy16, a naturally occurring oxysterol. *J Cell Biochem* 118:499-509 *doi:10.1002/jcb.25668*
- Wang H, Yuan LH, Ma WW *et al.* (2016) The cytotoxicity of 27-hydroxycholesterol in co-cultured SH-SY5Y cells and C6 cells. *Neurosci Lett* 632:209-217 *doi:10.1016/j.neulet.2016.08.056*
- Wang HB, Ramshekar A, Kunz E *et al.* (2021) 7-ketocholesterol induces endothelial-mesenchymal transition and promotes fibrosis: implications in neovascular age-related macular degeneration and treatment. *Angiogenesis* 24:583-595 *doi:10.1007/s10456-021-09770-0*
- Wang PY, Weng J, Anderson RG (2005) OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science* 307:1472-1476 *doi:10.1126/science.1107710*
- Wang S, Yao Y, Wang X *et al.* (2019a) 25-HC promotes hepatocellular carcinoma metastasis through up-regulation of TLR4 dependent FABP4. *Am J Cancer Res* 9:2140-2155
- Wang SF, Chou YC, Mazumder N *et al.* (2013) 7-Ketocholesterol induces P-glycoprotein through PI3K/mTOR signaling in hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 86:548-560 *doi:10.1016/j.bcp.2013.06.006*
- Wang SS, Yao YY, Rao CH *et al.* (2019b) 25-HC decreases the sensitivity of human gastric cancer cells to 5-fluorouracil and promotes cells invasion via the TLR2/NF- κ B signaling pathway. *Int J Oncol* 54:966-980 *doi:10.3892/ijo.2019.4684*
- Wang X, Briggs MR, Hua X *et al.* (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem* 268:14497-14504
- Wang XF, Li YT, Xia XY *et al.* (2020b) Mutagenicity of 7-ketocholesterol in CHO cells: The role of lipid peroxidation. *Toxicology* 446 *doi:10.1016/j.tox.2020.152587*
- Warns J, Marwarha G, Freking N *et al.* (2018) 27-hydroxycholesterol decreases cell proliferation in colon cancer cell lines. *Biochimie* 153:171-180 *doi:10.1016/j.biochi.2018.07.006*
- Wenzel JJ, Kaminski WE, Piehler A *et al.* (2003) ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 306:1089-1098 *doi:10.1016/s0006-291x(03)01097-0*
- Widschwendter M, Siegmund KD, Müller HM *et al.* (2004) Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 64:3807-3813 *doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3852*
- Willy PJ, Umesono K, Ong ES *et al.* (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9:1033-1045
- Woods JA, O'Brien NM (1998) Investigation of the potential genotoxicity of cholesterol oxidation products in two mammalian fibroblast cell lines. *Nutr Cancer* 31:192-198 *doi:10.1080/01635589809514702*
- Wu Q, Ishikawa T, Sirianni R *et al.* (2013) 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell Rep* 5:637-645 *doi:10.1016/j.celrep.2013.10.006*
- Wyles JP, McMaster CR, Ridgway ND (2002) Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277:29908-29918 *doi:10.1074/jbc.M201191200*
- Xiao QQ, Che XY, Cai B *et al.* (2020) Macrophage autophagy regulates mitochondria-mediated apoptosis and inhibits necrotic core formation in vulnerable plaques. *J Cell Mol Med* 24:260-275 *doi:10.1111/jcmm.14715*
- Xu L, Korade Z, Rosado DA *et al.* (2011) An oxysterol biomarker for 7-dehydrocholesterol oxidation in cell/mouse models for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res* 52:1222-1233 *doi:10.1194/jlr.M014498*

- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME *et al.* (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110:489-500
- Yang Y, Liu X, Wang X *et al.* (2022) Comprehensive analysis of ABCA family members in lung adenocarcinoma with prognostic values. *Mol Biotechnol* 64:1441-1453 *doi:10.1007/s12033-022-00506-z*
- Yang ZJ, Liu YX, Huang Y *et al.* (2023) The regrouping of Luminal B (HER2 negative), a better discriminator of outcome and recurrence score. *Cancer Med* 12:2493-2504 *doi:10.1002/cam4.5089*
- You JS, Lim H, Kim TH *et al.* (2020) 25-Hydroxycholesterol induces death receptor-mediated extrinsic and mitochondria-dependent intrinsic apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res* 40:779-788 *doi:10.21873/anticancerres.14009*
- You JS, Lim H, Seo JY *et al.* (2022) 25-Hydroxycholesterol-Induced Oxidative Apoptosis in L929 Mouse Fibroblast Cell Line. *Molecules* 27 *doi:10.3390/molecules27010199*
- Zabirnyk O, Liu W, Khalil S *et al.* (2010) Oxidized low-density lipoproteins upregulate proline oxidase to initiate ROS-dependent autophagy. *Carcinogenesis* 31:446-454 *doi:10.1093/carcin/bgp299*
- Zarrouk A, Vejux A, Mackrill J *et al.* (2014) Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res Rev* 18:148-162 *doi:10.1016/j.arr.2014.09.006*
- Zhang Q, Li K, Xu JH *et al.* (2013) Role of ABCG2 expression driven by cisplatin in platinum-containing chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 19:6630-6636 *doi:10.3748/wjg.v19.i39.6630*
- Zhang X, Alhasani RH, Zhou X *et al.* (2021) Oxysterols and retinal degeneration. *Br J Pharmacol* 178:3205-3219 *doi:10.1111/bph.15391*
- Zhang X, Yin X, Dai J *et al.* (2022) The tumor-repressing effect of CYP27A1 on renal cell carcinoma by 27-HC arising from cholesterol metabolism. *FASEB J* 36:e22499 *doi:10.1096/fj.202101146RR*
- Zhou Q, Jimi S, Smith TL *et al.* (1991) The effect of 25-hydroxycholesterol on accumulation of intracellular calcium. *Cell Calcium* 12:467-476 *doi:10.1016/0143-4160(91)90029-e*
- Zhou T, Li S, Zhong W *et al.* (2011) OSBP-related protein 8 (ORP8) regulates plasma and liver tissue lipid levels and interacts with the nucleoporin Nup62. *PLoS One* 6:e21078 *doi:10.1371/journal.pone.0021078*
- Zhu D, Shen Z, Liu J *et al.* (2016) The ROS-mediated activation of STAT-3/VEGF signaling is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced angiogenesis in human breast cancer cells. *Toxicol Lett* 264:79-86 *doi:10.1016/j.toxlet.2016.11.006*
- Ziedén B, Kaminskas A, Kristenson M *et al.* (1999) Increased plasma 7 beta-hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:967-971
- Zmyslowski A, Szterk A (2019) Oxysterols as a biomarker in diseases. *Clin Chim Acta* 491:103-113 *doi:10.1016/j.cca.2019.01.022*

9. Seznam příloh

Příloha 1

Kloudova, A., Brynychova, V., Vaclavikova, R., Vrana, D., Gatek, J., Mrhalova, M., Kodet R. and Soucek, P. (2017). Expression of oxysterol pathway genes in oestrogen-positive breast carcinomas. *Clinical Endocrinology*, 86(6), 852-861. *doi: 10.1111/cen.13337*.

Příloha 2

Kloudova, A., Guengerich, F. P., and Soucek, P. (2017). The role of oxysterols in human cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(7), 485-496. *doi: 10.1016/j.tem.2017.03.002*.

Příloha 3

Kloudova-Spalenkova, A., Ueng, Y. F., Wei, S., Kopeckova, K., Guengerich, F. P., & Soucek, P. (2020). Plasma oxysterol levels in luminal subtype breast cancer patients are associated with clinical data. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 197, 105566. *doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105566*.

Příloha 4

Kloudova-Spalenkova, A., Holy, P., & Soucek, P. (2021). Oxysterols in cancer management: From therapy to biomarkers. *British Journal of Pharmacology*, 178(16), 3235-3247. *doi: 10.1111/bph.15273*.

Příloha 5

Spalenkova, A., Ehrlichova, M., Guengerich, F.P., Wei, S., & Soucek, P.: Effects of 7-ketocholesterol on tamoxifen efficacy in breast carcinoma cell line models in vitro
Nepublikovaná data – přijato k publikaci v *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*