



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Role solubilní epoxid hydrolázy v signální dráze PI3K během
diferenciace střevních buněk *in vitro***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Koubová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Koubová
Název práce	Role solubilní epoxid hydrolázy v signální dráze PI3K během diferenciaci střevních buněk <i>in vitro</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Střevní buňky jsou jedny z nejrychleji se obnovujících buněk v lidském těle, a proto musí být jejich diferenciaci správně řízena. Solubilní epoxid hydroláza hraje roli v metabolismu kyseliny arachidonové a bylo již prokázáno, že pravděpodobně hraje roli v diferenciaci střevních buněk. PI3K signální dráha patří k mnoha signálním dráhám, které se v lidském těle vyskytují. Tyto dráhy musí mezi sebou interagovat, mají v různých tkáních odlišné působení, a jsou tak v různých tkáních různě ovlivňovány. V experimentální části této diplomové práce byla zkoumána exprese proteinů PTEN a fosforylovaného Akt, které patří do PI3K dráhy, po ovlivnění inhibitorem solubilní epoxid hydrolázy. Experimenty byly prováděny na lidské nádorové buněčné linii HT-29 v různých stupních diferenciaci. Bylo prokázáno, že použitý inhibitor solubilní epoxid hydrolázy ovlivňuje expresi proteinů z této dráhy a jeho vliv se liší v nediferencovaných a diferencovaných buňkách. Tyto informace jsou přínosné jak pro samotné objasnění fyziologických procesů, tak pro potencionální využití při onemocněních střev.

Klíčová slova	diferenciaci, střevní buňky, solubilní epoxid hydroláza, PI3K signální dráha
Počet stran	58
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Koubová
Title of thesis	The role of soluble epoxide hydrolase in PI3K signaling pathway during differentiation of intestinal cells <i>in vitro</i>
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Intestinal cells are rapidly renewing cells in the human body, so the process of their differentiation must be controlled very well. Soluble epoxide hydrolase, included in metabolism of arachidonic acid, was previously confirmed to play the role in intestinal cell differentiation. PI3K signaling pathway is one of the many signaling pathways in the human body, which interact and differently affect tissues in the body. Dysregulation of signaling pathways can also lead to damage and diseases. In experimental part of this thesis, expression of PTEN and fosforylated Akt as parts of PI3K signaling pathway were examined after administration of inhibitor of soluble epoxide hydrolase. Experiments were carried out on human cancer cell line HT-29 with various differentional status. Inhibition of soluble epoxide hydrolase affected proteins of interest with different results obtained for undifferentiated and differentiated cells. These results can be used not only as new information about physiological processes and for further research in this area, but also for potential intestinal disease treatment.

Keywords	differentiation, intestinal cells, soluble epoxide hydrolase, PI3K signaling pathway
Number of pages	58
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Kateřiny Čížkové, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne.....

Podpis.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Mgr. Kateřině Čížkové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, trpělivost a nadšení pro vědu, kterým mě nakazila. Dále děkuji celému Ústavu histologie a embryologie i Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP za umožnění provádění experimentů i za cenné připomínky. Také bych chtěla poděkovat všem blízkým za podporu při studiu i v životě.

OBSAH

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Histologická stavba střeva.....	10
2.1.1 Tenké střevo	10
2.1.2 Tlusté střevo	10
2.1.3 Buňky střevního epitelu.....	12
2.1.4 Obnova buněk střevního epitelu	13
2.2 Studium buněčné diferenciaci	15
2.2.1 Buněčné linie	15
2.2.2 Další modely.....	16
2.3 Solubilní epoxid hydroláza	16
2.3.1 Role solubilní epoxid hydrolázy v diferenciaci střevních buněk	18
2.4 Signální dráhy v diferenciaci střevních buněk	19
2.4.1 PI3K signální dráha	19
2.4.2 PI3K.....	21
2.4.3 Akt	22
2.4.4 PTEN	24
2.4.5 PI3K signální dráha a diferenciaci střevních buněk	26
2.4.6 PI3K signální dráha a solubilní epoxid hydroláza.....	27
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1 Použité přístrojové vybavení.....	28
3.2 Softwarové vybavení.....	28
3.3 Použité chemikálie	28
3.3.1 Soupravy.....	29
3.3.2 Roztoky.....	29
3.4 Biologický materiál.....	30
3.5 Metody	31
3.5.1 Kultivace buněk.....	31
3.5.2 Optimalizace protilátek	31
3.5.2.1 Příprava vzorků pro Western blot.....	32
3.5.2.2 Bradfordova metoda	33
3.5.2.3 Western blot.....	33

3.5.2.4 In-Cell ELISA.....	35
3.5.2.5 Imunocytochemické barvení.....	36
3.5.3 Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy TPPU	37
3.5.3.1 In-Cell ELISA.....	38
3.5.4 Statistické vyhodnocení.....	38
4 VÝSLEDKY	39
4.1 Optimalizace protilátek	39
4.1.1 Western blot.....	39
4.1.1.1 Bradfordova metoda	39
4.1.1.2 Western blot.....	40
4.1.2 In-Cell ELISA	40
4.1.3 Imunocytochemické barvení	41
4.2 Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy TPPU	44
4.2.1 In-Cell ELISA	44
5 DISKUZE	47
6 ZÁVĚR	50
SEZNAM LITERATURY	51

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Akt/PKB	proteinkináza B
CYP	cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EETs	epoxyeikosatrienové kyseliny
HDAC	histon deacetyláza
LGR5+	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
NaBt	butyrát sodný
PDK1	fosfoinositid-dependentní kináza
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PTEN	fosfatázový a tenzinový homolog deletovaný na chromozomu 10
RT	room temperature, pokojová teplota
sEH	solubilní epoxid hydroláza
TPPU	N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidiny]-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]urea

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Diferenciace buněk patří k nejdůležitějším procesům vývoje buněk a určuje jejich konečnou funkci i vzhled. Zvláště u střevních buněk probíhá tento proces v řádu dnů, je relativně rychlý a musí být dobře koordinovaný. Proto zde hraje roli mnoho signálních drah, mezi které patří i vybraná PI3K. Známé jsou především její dysregulace, které se podílí na vzniku např. nádorových onemocnění. Její působení na buněčné procesy ale nikdy není samostatné, vždy je zde propojení s dalšími signálními nebo metabolickými drahami. Méně prozkoumaná interakce mezi PI3K a solubilní epoxid hydrolázou (sEH) je tedy výzvou a může osvětlit nejenom jejich společné působení na diferenciaci střevních buněk, ale i možné využití této interakce v praxi.

Diplomová práce navazuje na výsledky mé vlastní bakalářské práce, ve které bylo zjištěno ovlivnění diferenciace střevních buněk sEH. Inhibice tohoto enzymu totiž v diferencovaných buňkách HT-29 snižuje expresi villinu, jednoho z proteinů podílejících se na výstavbě mikrovklků. Pro zjištění propojení PI3K signální dráhy se sEH byly vybrány proteiny fosforylovaný Akt a PTEN. Pro jejich detekci bylo nejdříve potřeba provést optimalizaci primárních protilátek proti těmto proteinům pomocí několika metod (imunocytochemické barvení, In-Cell ELISA a Western blot). Imunocytochemickým barvením byla ověřována předpokládaná subcelulární lokalizace proteinů v buňkách nádorové buněčné linie HT-29. Pro metodu In-Cell ELISA bylo vybráno několik ředění pro obě primární protilátky. Western blot byl proveden pro ověření exprese obou proteinů v nediferencovaných a diferencovaných buňkách. Po optimalizaci byla provedena In-Cell ELISA s vybranými ředěními primárních protilátek a měřena relativní exprese fosforylovaného Akt a PTEN v nediferencovaných a diferencovaných buňkách HT-29, které byly ovlivněny inhibitorem solubilní epoxid hydrolázy. Experimentální část je doplněna teoretickou částí, která dále osvětluje probírané téma, pomáhá zorientovat se ve studované problematice a mapuje dosud známé informace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Histologická stavba střeva

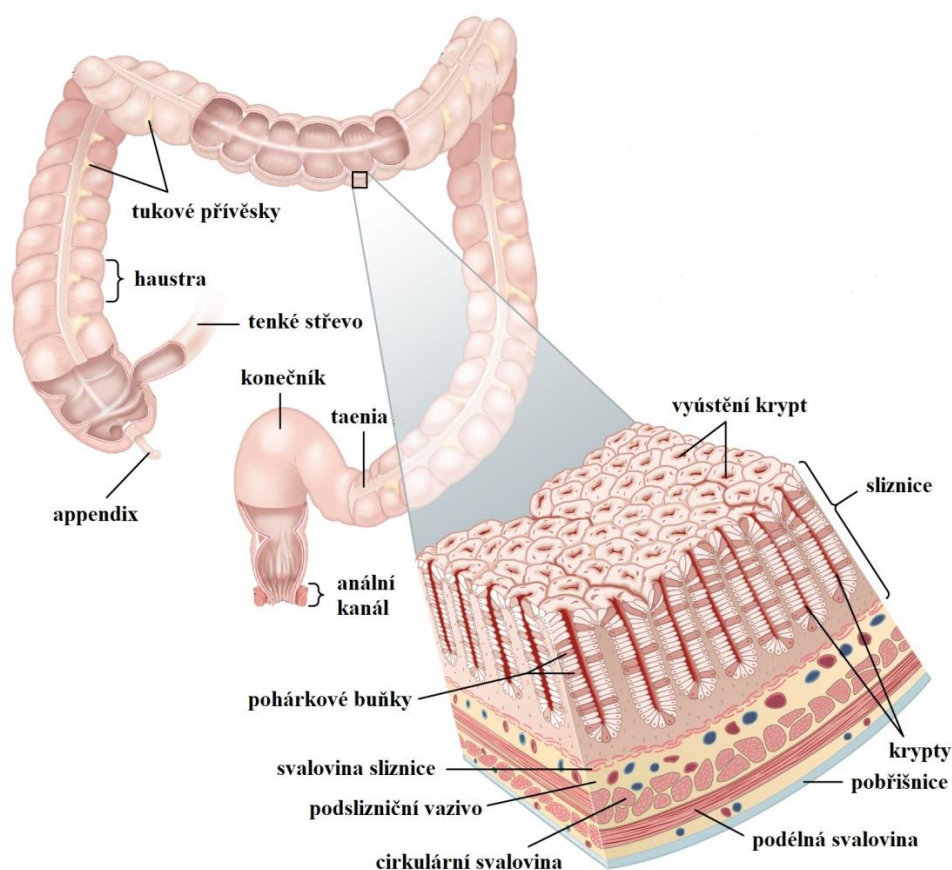
2.1.1 Tenké střevo

Tenké střevo (*intestinum tenue*) je důležitý orgán trávicí soustavy, ve kterém dochází k vstřebávání většiny živin z potravy. Je široké 3–4 cm, dlouhé 3–5 m a skládá se ze tří částí: dvanáctníku (*duodenum*), lačníku (*jejunum*) a kyčelníku (*ileum*). Jejunum a ileum jsou připojeny pomocí okruží (*mesenterium*) k zadní stěně břišní dutiny. Stěna tenkého střeva má čtyři vrstvy, stejně jako zbytek částí trávicí soustavy. Tyto vrstvy jsou od průsvitu (*lumen*) střeva směrem ven: sliznice (*tunica mucosa*) skládající se z vrstvy epitelu, slizničního vaziva (*lamina propria mucosae*) a slizniční svaloviny (*lamina muscularis mucosae*), podslizniční vazivo (*tunica submucosa*), svalovina (*tunica muscularis*) a v břišní dutině povrchová vrstva seróza (*tunica serosa*). V podslizničním vazivu se nachází jedna z nervových pletení (*plexus submucosus Meissneri*) a cévní zásobení. Svalová vrstva je z hladké svaloviny a dělí se na obtáčející (*stratum circulare*) a podélnou (*stratum longitudinale*), mezi nimiž se nachází druhá nervová pleteň (*plexus myentericus Auerbachii*). Povrch serózy je krytý jednovrstevným plochým epitelem – mezotelem. Sliznice střeva je zprohýbána v příčné řasy (*plicae circulares*), je členěna na klky (*villi intestinales*) a Lieberkühnovy krypty (*glandulae intestinales*). Klky slouží ke zvětšení povrchu střeva. V duodenu se také ve sliznici a podslizničním vazivu nacházejí Brunnerovy žlázy, které produkují alkalický hlen, který neutralizuje chymus přicházející ze žaludku (Čihák, 2002; Mescher, 2016).

2.1.2 Tlusté střevo

Tlusté střevo (*intestinum crassum*) je jedna z důležitých částí organismu týkající se výživy, rovnováhy iontů a vody, a vylučování. Je dlouhé 1,3–1,7 m a široké 4–7,5 cm. Skládá se ze slepého střeva (*caecum*) s červovitým výběžkem (*appendix vermiformis*), tračníku vzestupného, příčného, sestupného, a esovité kličky (*colon ascendens, transversum, descendens, et sigmoideum*), konečníku (*rectum*) a análního kanálu (*analís canalis*). Stěna tlustého střeva se stejně jako další části trávicí trubice skládá ze sliznice, která se skládá z epitelu, slizničního vaziva a slizniční svaloviny, podslizničního vaziva, ve kterém se nachází také podslizniční nervová pleteň s cévním zásobením, svalové vrstvy dělicí se na cirkulární a podélnou, mezi nimiž je uložena myenterická nervová pleteň, a serózy nebo adventicie (*tunica adventitia*). U tlustého střeva se sliznice a podslizniční vazivo

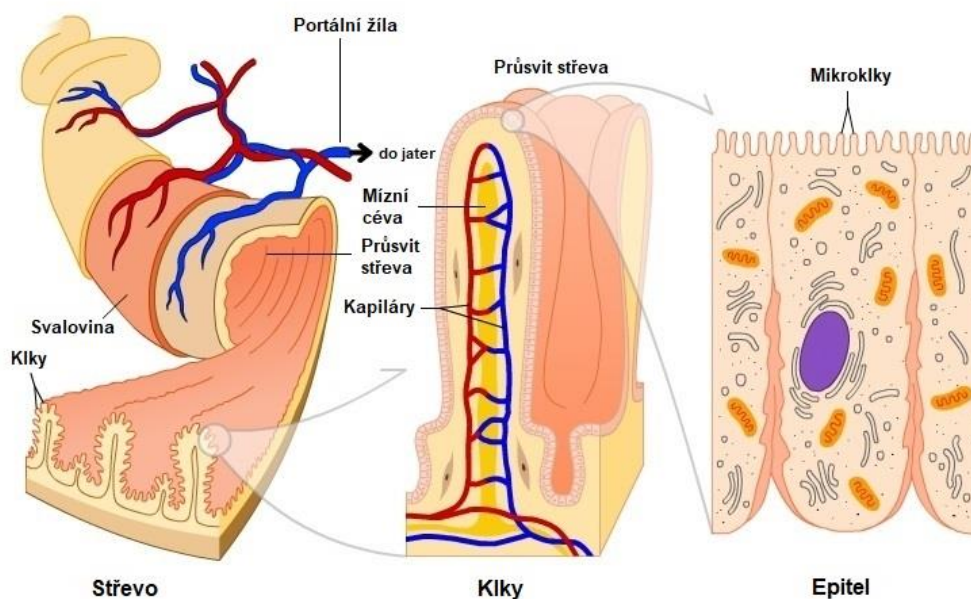
uspořádává v cirkulární řasy (*plicae semilunares*), jejichž poloha se může měnit kvůli přechodným kontrakcím svaloviny. Na povrch sliznice ústí velké množství Lieberkühnových krypt (Obr. 1). Na rozdíl od tenkého střeva nemá sliznice klky. Podélná vrstva svaloviny tračníku se dělí do tří 8–10 mm tlustých pruhů zvaných *taeniae coli* (*t. libera*, *t. mesocolica*, *t. omentalis*). Kontrakcemi taenií vznikají pohyby střeva, které vytváří oddíly zvané *haustra coli* a tento pohyb střev se nazývá haustrace. Na povrchu tlustého střeva se pod pobřišnicí nebo adventicií nachází vazivo s tukovými buňkami, které tvoří u taenií tukové přívěsky (*appendices epiploicae*) (Čihák, 2002; Lüllmann-Rauch, 2012; Malínský *et al.*, 2018; Mescher, 2018).



Obrázek 1: Tlusté střevo s detailem jeho stěny (upraveno dle Encyclopaedia Britannica: <https://www.britannica.com/science/large-intestine>; staženo 10. 9. 2020).

2.1.3 Buňky střevního epitelu

Sliznici střeva kryje jednovrstevný prizmatický (cylindrický) epitel, který obsahuje několik typů buněk. V tenkém střevě mezi tyto buňky patří enterocyty, pohárkové buňky, enteroendokrinní buňky, Panethovy buňky a M buňky. Klky slouží ke zvětšení povrchu střeva, na kterém dochází k enzymatickému rozkladu živin z potravy a jejich vstřebávání do krve. Enterocyty, které se na klcích nachází, mají na svém apikálním povrchu mikrokylky, které ještě více zvětšují povrch střeva. Tyto mikrokylky jsou pravidelně uspořádané a vytváří kartáčový lem (Obr. 2).



Obrázek 2: Enterocyty s mikrokylky a jejich umístění ve střevě (upraveno dle University of Waikato: <https://www.sciencelearn.org.nz/images/2259-villi-in-the-small-intestine>; staženo 26. 11. 2020).

Enterocyty jsou důležitými buňkami při absorpci živin z potravy. K enzymům nacházejícím se v kartáčovém lemu patří disacharázy, které štěpí disacharidy na vstřebatelné monosacharidy, peptidázy štěpící různě dlouhé peptidy na jednotlivé aminokyseliny, nukleázy štěpící nukleové kyseliny, a lipáza, která rozkládá monoacylglyceroly na glycerol a mastné kyseliny. Pohárkové buňky produkují hlen obsahující mucin (glykoprotein), který vytváří ochrannou vrstvu před mechanickým poškozením. Panethovy buňky se nachází na dně Lieberkühnových krypt pod úrovní kmenových buněk, mají tedy nezanedbatelný vliv na prostředí v kryptách a jsou součástí

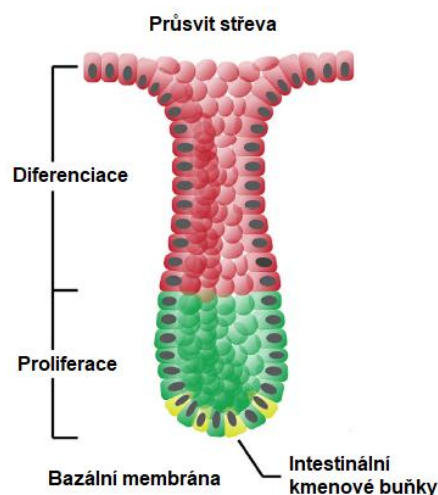
nespecifické imunity. Jako exokrinní buňky produkují defenziny, lysozym a fosfolipázu A₂, které ničí nepřátelské mikroorganismy. M (membránové) buňky jsou další buňky, které se účastní imunitních procesů ve střevě. Nachází se na povrchu Peyerových plátů a jsou schopny pomocí endocytózy přenést antigen ke kompetentním buňkám v jejich blízkosti jako lymfocyty a dendritické buňky. Dále se v epitelu nachází různé typy enteroendokrinních buněk, které se vyskytují v různých částech trávicí soustavy a jsou zodpovědné za produkci určitého hormonu. V tenkém střevě se jedná o D buňky (produkují somatostatin), I buňky (cholecystokinin), K buňky (žaludeční inhibiční polypeptid), Mo buňky (motilin), N buňky (neurotensin) a S buňky (sekretin). (Mescher, 2016).

V tlustém střevě je epitel tvořen kolonocyty, pohárkovými buňkami a menším množstvím enteroendokrinních buněk. Kolonocyty jsou vysoké cylindrické buňky s nepravidelnými mikrokly, které se nachází na povrchu střeva i v kryptách. Nachází se zde rozšířené mezibuněčné prostory, které vstřebávají vodu, což způsobuje zahušťování stolice. Proces vstřebávání vody je řízen aldosteronem. Díky této resorpci se vstřebá 1,5 l denně společně s ionty Na⁺ a Cl⁻. Některé kolonocyty v kryptách však mohou i vodu vylučovat. V tlustém střevě je zvýšený počet pohárkových buněk, které se dají řadit mezi sekreční epitel jako jednobuněčné žlázy, protože vylučují muciny, které tvoří silnou hlenovou vrstvu a chrání epitel proti bakteriím i mechanickému poškození. Zástupci enteroendokrinních buněk v tlustém střevě jsou EC buňky produkující serotonin a substanci P stimulující střevní motilitu. Dále pak L buňky produkující GLP-1 (peptid podobný glukagonu) pro sekreci inzulínu a peptid YY pro resorpci vody a elektrolytů. EC a L buňky se nachází také v tenkém střevě (Čihák, 2002; Young *et al.*, 2006; Lüllmann-Rauch, 2012; Mescher, 2018).

2.1.4 Obnova buněk střevního epitelu

Buňky střevního epitelu patří k nejrychleji se obnovujícím buňkám v lidském těle. Výzkum v této oblasti započal v 70–80. letech 20. století od vývoje modelů střevního epitelu a kmenových buněk po molekulární markery. Životnost většiny střevních buněk je cca 6 dnů, Panethovy buňky se obnovují po 3–6 týdnech. Všechny střevní buňky pochází z kmenových buněk, které se nachází u dna Lieberkühnových krypt. Vedle kmenových buněk označovaných jako LGR5⁺ (*leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5*) se v kryptách nachází +4 kmenové buňky (pozice 4 ode dna krypty), které při poškození vytváří nové LGR5⁺ buňky. Kromě kmenových buněk

se v kryptách tenkého střeva nachází Panethovy buňky a dochází mezi nimi ke komunikaci. Z Panethových buněk zde vychází buněčná signalizace, která ovlivňuje činnost kmenových buněk ohledně jejich dělení až po distribuci živin. V kryptách tlustého střeva kmenové buňky ovlivňují zvláštní typy pohárkových buněk (CD24+, KIT+) (Barker, 2014; Spit *et al.*, 2018). Obnova buněk střevního epitelu začíná u dna krypt. Část krypty s kmenovými buňkami se nazývá nika (*niche*), jako seskupení více kmenových buněk (pravděpodobně 7–12), které se dělí a produkují tak proliferativní TA (*transit amplifying*) buňky. Tyto buňky se cca třikrát dělí a během tohoto procesu je rozhodnuto, jestli se dále vydají cestou diferenciaci v absorpční nebo sekreční buňky. Buňky migrují z krypt až k povrchu střeva (Obr. 3) a na vrchol klku, kde dochází k apoptóze. Typ této programované buněčné smrti se nazývá *anoikis* (řecký význam „být bez domova“) a buňky jsou tímto způsobem odlučovány ze sliznice ztrátou spojení s extracelulární hmotou. Panethovy buňky pochází ze sekrečně determinovaných TA buněk, které se diferencují směrem ke dnu krypty, kde diferencované zůstávají (Frisch *et Francis*, 1994; Lüllmann-Rauch, 2012; Barker, 2014).



Obrázek 3: Schéma Liberkühnovy krypty a diferencování buněk (upraveno dle Dutton *et al.*, 2019).

2.2 Studium buněčné diferenciace

Studium diferenciace je neodmyslitelně spjata se studiem kmenových buněk. Poprvé byla prokázána existence střevních kmenových buněk v roce 1970 Chengem a Leblondem, kteří experiment prováděli na myších. Dalším objevem bylo v roce 2007 zjištění, že buňky na dně střevních krypt exprimují LGR5+, který se stal markerem střevních kmenových buněk (Buczacki, 2019). Studium diferenciace si vyžaduje efektivní modely, mezi které patří především buněčné linie z orgánů nebo nádorů. Použití různých buněčných linií však může mít limity, metabolismus a reakce buněk nemusí odpovídat skutečnému prostředí v organismu. Mezi komplexnější modely patří organoidy, které jsou však časově i finančně náročnější než nádorové buněčné linie.

2.2.1 Buněčné linie

Pro studium buněčné diferenciace i dalších buněčných procesů se nejčastěji používají buněčné linie pro svoje relativně jednoduché pěstování, cenovou dostupnost a široký výběr. Buněčné linie mohou být primární, tj. pocházet přímo z orgánu, anebo sekundární, pocházející z nádorů tohoto orgánu. Nádorové buněčné linie jsou snadno dostupné, a proto existuje mnoho druhů a verzí. První nádorovou buněčnou linií byly HeLa buňky získané v roce 1952. Jako první nádorová buněčná linie tlustého střeva byla linie HT-29 odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva v roce 1964 (Simon-Assmann *et al.*, 2007; Mescher, 2018).

V kryptách střev dochází často k maligní transformaci buněk, proto je většina buněčných linií těchto orgánů získána právě z nádorů. Nádorové střevní linie buněk se dále dělí na spontánně diferencující a indukčně diferencující. Mezi nejčastěji spontánně diferencující patří nádorová linie Caco-2. Pochází z adenokarcinomu tlustého střeva a diferencuje se v buňky absorpční. Ke spontánní diferenciaci dochází při kultivaci buněk po dosažení konfluence. Jejich diferenciaci však může být indukována také butyrátem sodným. Mezi další linie odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva patří SW480 nebo LS174T (Pereira *et al.*, 2016).

V experimentální části této práce byla použita indukčně diferencující nádorová buněčná linie HT-29. Linie obsahuje buňky s epiteliální morfologií a nachází se zde menší množství pohárkových buněk tvořících mucin. Buňky této buněčné linie nesou mutaci genů APC, TP53 a BRAF (Pereira *et al.*, 2016). Pro indukci diferenciace byl použit butyrát sodný (NaBt), který funguje jako inhibitor histondeacetyláz (HDAC). Normální střevní buňky jej produkují anaerobní fermentací vlákniny, ze které vznikají různé dlouhé řetězce

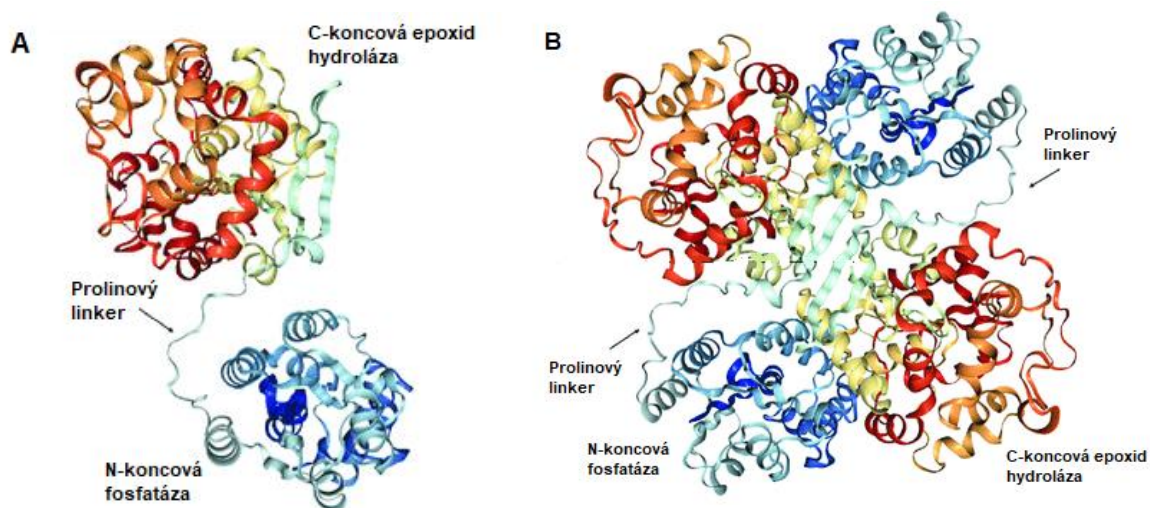
mastných kyselin. Čtyřuhlíkatý NaBt je jejich nejvýznamnější zástupce. U střevních buněk funguje jako zdroj energie, udržuje správné pH a indukuje proliferaci a růst buněk. U buněčných linií nádorových buněk však NaBt pozastavuje buněčný cyklus, indukuje diferenciaci a apoptózu. K diferenciaci mohou být použity i další látky jako forskolin, metotrexát, nebo pouhá záměna glukózy za galaktózu v kultivačním médiu (Cohen *et al.*, 1999; Martínez-Maqueda *et al.*, 2015). Bylo prokázáno, že HT-29 je vhodná pro experimentální použití při studiu exprese CYP (cytochrom P450) epoxigenáz i sEH (solubilní epoxid hydroláza) a diferenciaci střevních buněk (Byun *et al.*, 2011; Ryšávka *et al.*, 2018; Čížková *et al.*, 2020).

2.2.2 Další modely

Kromě buněčných linií, které se většinou pěstují v 2D uspořádání na plastovém povrchu, se začalo používat i 3D uspořádání, které by mohlo lépe odpovídat reálným podmínkám v prostředí organismu. Tato 3D uspořádání jsou založena na vytváření sferoidních útvarů, nebo použití opory ve formě hydrogelů a biomateriálů. Mezi další modely studia diferenciaci mohou patřit organoidy, které vznikají z odebrané tkáně pacienta, nebo nádoru, ze kterých se pěstuje zmenšená verze tohoto orgánu nebo novotvaru. Vytváří tak pravděpodobně lepší architektonickou strukturu studovaného epitelu, ale stále u nich chybí interakce s buňkami mezenchymu, které tvoří enterický nervový systém, cévy, imunitní buňky, anebo chybí interakce s mikroorganismy (Pereira *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2020).

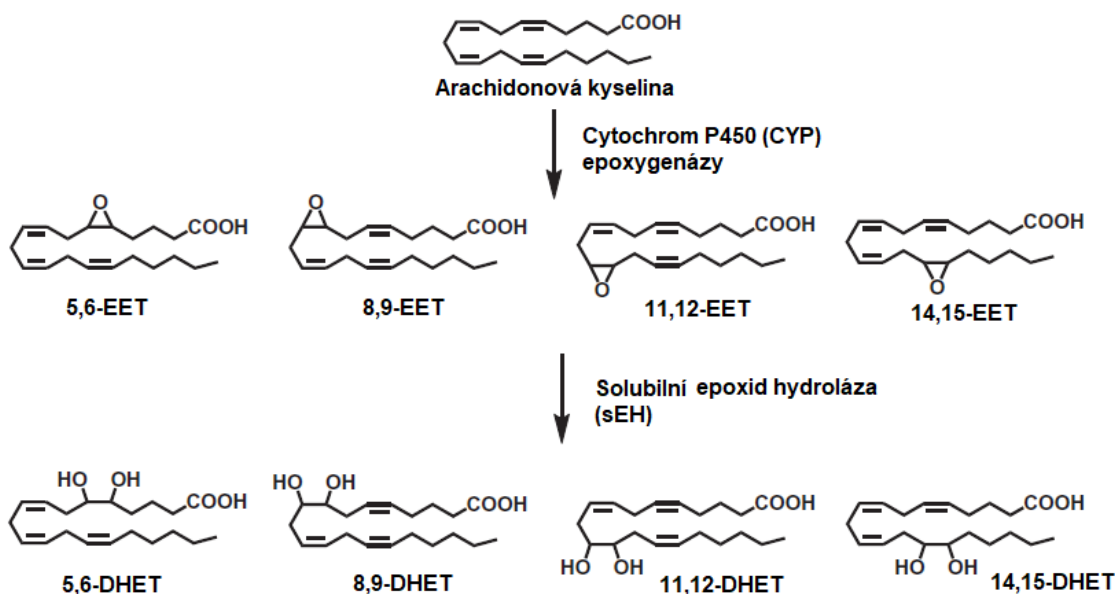
2.3 Solubilní epoxid hydroláza

Solubilní epoxid hydroláza (sEH) je enzym u člověka kódovaný genem *EPHX2* na chromozomu 8 (8p21.2-p21.1) (Morisseau *et al.*, 2013; UCSC Browser, 2013). Byl identifikován v roce 1976 při studiu lipidových epoxidů a juvenilních hormonů, a poprvé izolován v roce 1993 (Hammock *et al.*, 1976; Beetham *et al.*, 1993). Je to homodimer o molekulové hmotnosti 125 kilodaltonů (kDa), jehož dvě domény propojené prolinovým linkerem na každém monomeru mají různé funkce. Na C-konci se nachází její epoxid hydrolázová aktivita (EC 3.3.2.10) a na N-konci fosfatázová aktivita (EC 3.1.3.76) (Morisseau *et al.*, 2013) (Obr. 4).



Obrázek 4: 3D struktura sEH (A) monomeru, (B) homodimeru (upraveno dle Domingues *et al.*, 2020).

Enzym se nachází v různých tkáních, od mozku až po střeva a ledviny. Ve větším množství se nachází ve střevech, játrech, ledvinách, mozku a cévách. Nižší exprese se nachází v plicích, slezině a varlatech (Norwood *et al.*, 2010). Kromě normálních zdravých tkání je exprese sEH popsána také v nádorech tlustého střeva, ledvin a varlat, na druhou stranu nižší exprese byla v nádorech jater nebo slinivky (Hu *et al.*, 2018). V buňkách se sEH nachází v cytosolu, a také v peroxizomech. Substráty tohoto enzymu jsou epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs, $C_{20}H_{32}O_3$) (Obr. 5), které jsou generovány z kyseliny arachidonové (all-cis-5,8,11,14-eikosatetraenová kyselina, $C_{20}H_{32}O_2$) cytochrom P450 (CYP) epoxxygenázami (rodiny CYP2C a CYP2J). Čtyři vzniklé regioizomery (5,6-, 8,9-, 11,12- a 14,15-EET) jsou sEH dále metabolizovány na dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs, $C_{20}H_{34}O_4$), které jsou charakterizovány nižší reaktivitou než jejich předchůdci. EETs mají v organismu řadu funkcí. Je známo, že mají protizánětlivé a vazodilatační účinky, aktivují EGFR (*epidermal growth factor receptor*), způsobují vypuštění růstového faktoru, který aktivuje Akt v PI3K signální dráze a indukuje expresi cyklinu D1. Toto vede k proliferaci endoteliálních buněk *in vitro* a k angiogenezi (Ruth Michaelis *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007; Bellien *et Joannides*, 2013; Hu *et al.*, 2018). Kromě EETs slouží jako substráty sEH také epoxyeikosatetraenové kyseliny (EEQs), které vznikají z eikosapentanové kyseliny, a epoxydokosapentaenové kyseliny (EDPs), které vznikají z dokosahexanové kyseliny (DHA). Tyto substráty sEH také metabolizuje na dioly (Newman *et al.*, 2005; Morisseau *et Hammock*, 2013; He *et al.*, 2015).



Obrázek 5: Metabolismus kyseliny arachidonové, epoxyeikosatrienových kyselin (EETs) a jejich výsledné dioly (upraveno dle Zhang *et al.*, 2014).

2.3.1 Role solubilní epoxid hydrolázy v diferenciaci střevních buněk

Potenciální roli sEH v diferenciaci střevních buněk naznačuje exprese tohoto enzymu ve vzorcích embryonálního a fetálního střeva, stejně jako tkání dospělých jedinců. Jak bylo zmíněno výše, v kryptách střeva se nachází buňky nediferencované, zatímco na apikální části klků (v případě tenkého střeva) nebo na lumenálním povrchu (v případě tlustého střeva), se nachází buňky diferencované. Pomocí imunohistochemického barvení bylo prokázáno, že exprese sEH narůstá podle osy krypta-klk (Čížková *et al.*, 2016). Toto rozložení exprese bylo nezávislé na věku a typu střevní tkáně. Nárůst exprese sEH byl prokázán také u buněčných linií HT-29 a Caco-2 diferencovaných *in vitro* (Čížková *et al.*, 2020).

Potencionální vliv solubilní epoxid hydrolázy na diferenciaci střevních buněk byl také studován v rámci mé bakalářské práce (Koubová, 2019) a publikován v práci Čížková *et al.* (2021). Účinky sEH byly testovány použitím inhibitoru s názvem TPPU, který byl použit ve dvou různých koncentracích (1 μ M a 10 μ M). Pro tento experiment byly použity diferencované, nediferencované a diferencující buňky HT-29. Ve zmíněných pracích bylo prokázáno, že sEH ovlivňuje diferenciaci buněk měřením exprese markerů diferenciaci, hlavně villinu, jehož exprese byla po použití inhibitoru u diferencovaných

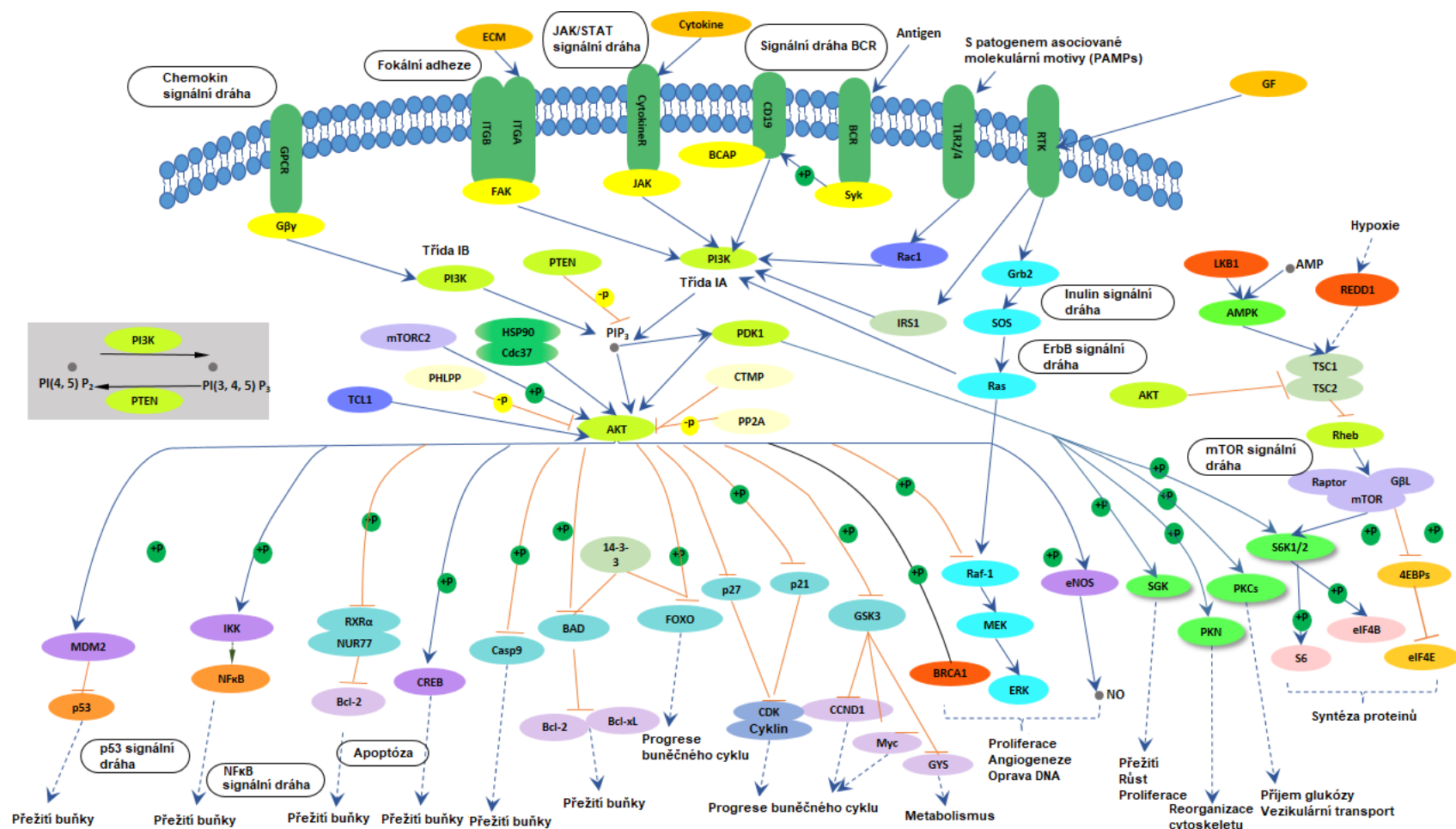
buněk snížena, a bylo pozorováno narušení struktury mikrokľků. Detailní působení na signální dráhy buněčného cyklu však nebylo zkoumáno.

2.4 Signální dráhy v diferenciaci střevních buněk

Signální dráhy patří mezi nejdůležitější komunikační kanály buněk na molekulární úrovni. Jejich fungování je založeno na vytvoření signálu (signální molekula), jeho přenosu k požadovanému cíli (buňka), rozeznání signálu danou buňkou pomocí receptoru a přenosu tohoto signálu dovnitř buňky, kde může dojít k jeho transportu do jádra a reakci buňky na tento signál. Signální dráhy jsou v mnoha případech propojeny a mohou se tedy i navzájem ovlivňovat. Zmíněné signály mohou být endokrinní, parakrinní nebo cytokinové. Signální dráha se podle výše zmíněného průběhu skládá ze čtyř komponent: aktivovaného receptoru v membráně nebo uvnitř buňky, enzymů v buňce, které šíří a modulují signál, transkripčních faktorů, které regulují genovou expresi, a dalších koregulátorů, které mohou zasahovat např. do transkripce (Ochsner *et al.*, 2019). U intestinálních kmenových buněk hrají roli různé signální dráhy. PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza) signální dráha, ERK1/2 a p38 MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza) dráhy bývají aktivní hlavně pro proliferaci buněk v kryptách a pro diferenciaci musí být utišeny (Aliaga *et al.*, 1999; Laprise *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2010).

2.4.1 PI3K signální dráha

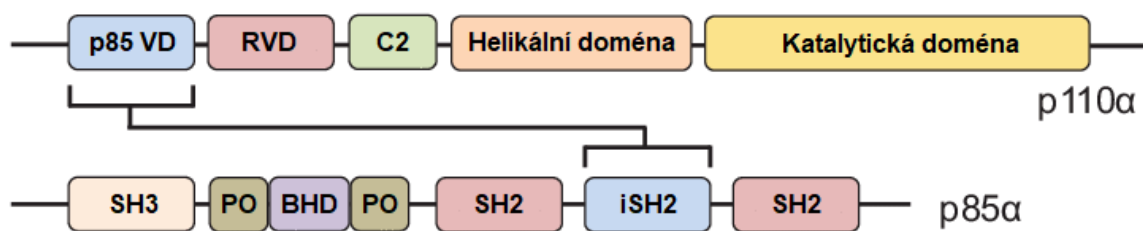
PI3K signální dráha patří k esenciálním dráhám buněk a je propojena s dalšími signálními dráhami. Umožňuje jejich přežití, ale i apoptózu. Dráha přenáší signály v různých směrech a procesech (Obr. 6), upstream regulační proteiny zahrnují např. PI3K, PTEN, RTKs (receptory tyrozinkináz), a downstream efekторы např. GSK3 β (glykogensyntáza kináza), FOXO (*forkhead box protein O*) a MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) (Ersahin *et al.*, 2015). Základy jejího objevení sahají do 70. let 20. století, kdy byl v roce 1977 objeven virový onkogen AKT8. Enzym PI3K byl izolován v roce 1990 a samotné geny pro Akt, nebo také proteinkinázu B (PKB), byly identifikovány v roce 1991 (Brazil *et al.*, 2001). Antagonista v této dráze, fosfatáza PTEN byl objeven až v roce 1997 (Parsons, 2020).



Obrázek 6: Schéma PI3K signální dráhy s vybranými účinky na buňky (převzato a upraveno dle Cusabio Technology: <https://www.cusabio.com/pathway/PI3K-Akt-signaling-pathway.html>; staženo 9. 10. 2020).

2.4.2 PI3K

Rodina lipidových kináz pojmenovaná fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3Ks) byla objevena v polovině 80. let 20. století a vzápětí bylo zjištěno, že hraje důležitou roli v mnoha buněčných procesech (Faes *et al.*, 2015). PI3K se účastní většiny procesů, které jsou pro buňky životně důležité, jako buněčný růst, vezikulární transport, inzulinem regulovaný příjem glukózy, apoptózu nebo diferenciaci. U některých druhů rakoviny dochází ke konstantní aktivaci PI3K, čímž bývá regulována mitogeneze, antiapoptotické procesy i reorganizace cytoskeletu, které přispívají k malignímu zvratu a vzniku metastáz (Brabletz *et al.*, 2009; Bahrami *et al.*, 2018). Fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K) je ubikvitin lipidová kináza, která bývá složena ze dvou podjednotek – regulační podjednotky (p85) obsahující Src-homologní domény 2 a 3 (SH2 domény) a iSH2, která ji spojuje s druhou podjednotkou, s katalytickou podjednotkou (p110), která obsahuje C2 doménu vázající se k plazmatické membráně (Wang *et al.*, 2001; Castel *et al.*, 2014) (Obr. 7).



Obrázek 7: Schématické zobrazení domén a regulačních podjednotek PI3K (izoformy α) s vyobrazením místa interakce podjednotek (upraveno dle Castel *et al.*, 2014). Legenda: VD – vazebná doména, RVD – Ras VD, SH3 a SH2 – Src-homogní 3/2 doména, iSH2 – inter-SH2, PO – prolinová oblast, BHD – Brc-homologní doména.

Katalytická podjednotka p110 pak aktivuje a fosforyluje inositolový kruh v pozici D3 u řady fosfatidylinositidových substrátů přeměnou fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP2) na fosfatidylinositol-3,4,5,-trisfosfát (PIP3). Tento krok dále přivede Akt, fosfoinositid-dependentní kinázu (PDK1) a komplex 2 mTOR (mTORC2, *mammalian target of rapamycin*) k plazmatické membráně, kde dojde k aktivaci Akt pomocí PDK1 nebo mTORC2. Aktivovaný (fosforylovaný) Akt (pAkt) pak následně může sám fosforylovat více než sto dalších proteinů. Jako antagonistu v této dráze vystupuje PTEN, který jako fosfatáza defosforyluje PIP3, čímž zabráňuje aktivaci Akt.

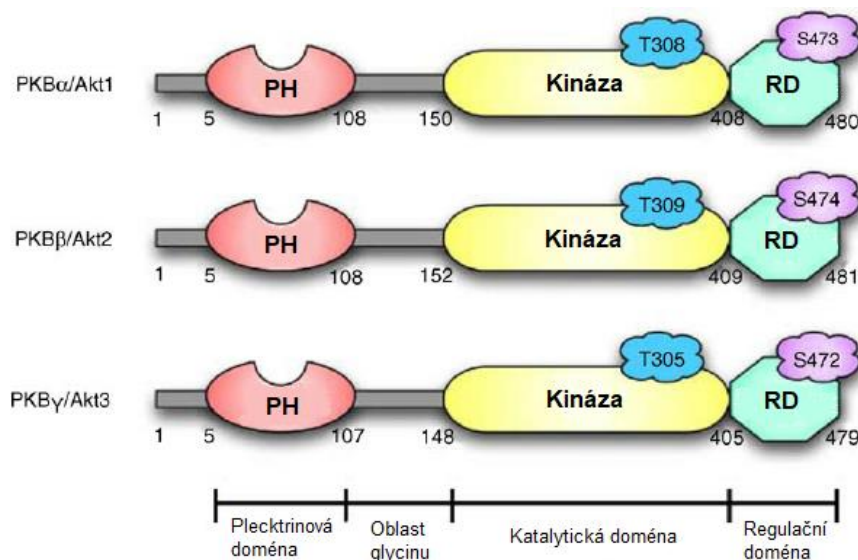
Členové PI3K rodiny byli rozděleni do tří skupin podle primární sekvence, doménové struktury, možností regulace a *in vitro* substrátové preference (Alberts *et al.*, 2008; Castel *et al.*, 2014; Bahrami *et al.*, 2018). Dělení skupin je na PI3K I., II. a III. třídy, z nichž I. třída se dále dělí na podskupiny IA a IB. U lidských nádorů hrají roli jen PI3K skupiny IA. Aktivace enzymů třídy IA se objevuje převážně přes receptory tyrozin kináz (RTKs) a některé onkogeny jako *Ras* (*rat sarcoma*, sarkom potkanů). Enzymy třídy IB jsou na rozdíl od předchozích regulovány jen G-protein párovými receptory. U tříd II a III se u enzymů nachází jenom jedna katalytická podjednotka, na rozdíl od enzymů třídy I, kde se nachází dvě různé podjednotky, a tyto mohou mít různé izoformy (Voet *et Voet*, 2011; Faes *et Dormond*, 2015). Katalytická podjednotka má 4 izoformy (p110 α /β/δ/γ) kódované geny *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD* a *PIK3CG*. Většina buněk obsahuje izoformy α a β , další dvě bývají přítomné u leukocytů. Izoformy pro regulační podjednotku p85 jsou také 4 a vznikají alternativním sestřihem genu *PIK3R1* (Castel *et al.*, 2014).

2.4.3 Akt

Akt/PKB (Ak z *AKR mouse strain*, t ze slova *thymom*, PKB proteinkináza B) je serin/threoninová proteinkináza, která hraje roli v mnoha životně důležitých procesech buňky, jako jsou proliferace, transkripce a migrace. Gen *AKT8* zodpovědný za produkci proteinu je buněčným homologem *v-akt*, akutně transformujícího retroviru u myši. V roce 1991 tři na sobě nezávislé týmy klonovaly a charakterizovaly Akt kinázy, a protože dva z těchto týmů hledaly novou protein kinázu spojenou s proteinkinázami A a C, tak se Akt označuje také jako proteinkináza B (PKB) (Franke, 2008; Bahrami *et al.*, 2018).

Akt patří do rodiny AGC kináz, které jsou blízké AMP/GMP kinázám a proteinkináze C (Porta *et al.*, 2014). K fosforylaci Akt dochází pomocí PDK1, která obsahuje plecktrin-homologní (PH) doménu a serin/threonin kinázovou doménu. Za fyziologických podmínek se PDK1 nachází v plazmatické membráně nestimulovaných buněk, kde zůstává jako aktivní enzym. Akt se přesouvá z cytoplazmy k plazmatické membráně až potom, co se zvýší hladina D3-fosfoinositidů díky PI3K (Franke, 2008). Kromě PDK1 může být Akt aktivován i mTORC2 (Castel *et al.*, 2014). Akt má tři izoformy Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) a Akt3 (PKB γ) kódované geny, které jsou strukturně homologní a mají stejné aktivační procesy, ale jejich konkrétní funkce se liší (Franke, 2008). Každý gen se nachází na jiném chromozomu – *AKT1* na

14q32.33, *AKT2* na 19q13.2 a *AKT3* na 1q43-q44 (NCBI databáze, 2020). Všechny tři izoformy Akt obsahují struktury jako N-terminální regulační doménu s PH doménou, spojovací oblast bohatou na glycin připojující PH doménu ke kinázové doméně se serin/threoninovou specifitou, a C-terminální oblast nezbytnou pro indukci a udržování kinázové aktivity (Obr. 8) (Elghazi *et al.*, 2006; Bahrami *et al.*, 2018).



Obrázek 8: Struktura a rozdíly mezi izoformami Akt/PKB (upraveno dle Elghazi *et al.*, 2006).

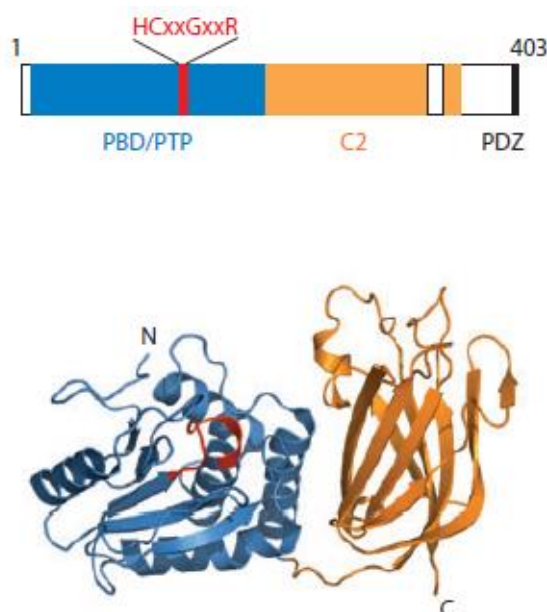
Akt1 zprostředkovává růst a přežití buňky, naproti tomu Akt2 kontroluje buněčnou invazivitu a mezenchymální charakteristiky (Faes *et al.*, 2015). Akt1 je exprimován ve velkém množství ubiquitinační cestou v mozku, plicích a srdci, podobně jako Akt2, který je ale také exprimován v inzulin-senzitivních tkáních jako jsou játra, kosterní svaly a tuková tkáň. Jeho exprese je zvýšená právě při diferenciaci tukové tkáně a kosterního svalstva. Akt3 je exprimován nejvíce v mozku a varlatech a v menším množství ve střevech a svaích. Aktivace Akt zahrnuje mnoho biologických funkcí, mezi které patří glukózový transport, glykolýza, syntéza glykogenu, růst buněk a suprese apoptózy. Mezi jedním z prvních identifikovaných cílů Akt byl proapoptotický Bcl2-antagonista proteinu smrti (BAD). Akt hraje důležitou roli v udržování mitochondriální integrity tak, aby cytochrom c a další apoptogenní faktory zůstaly uvnitř mitochondrie. Také bylo zjištěno ovlivnění JNK (c-Jun N-terminální kináza) a p38 signálních drah zvýšenou Akt aktivitou. Indukci Akt aktivity způsobuje také hormon leptin, který vyvolává aktivitu *in vitro* i *in vivo* v dráhách paralelních k signalizaci inzulinem. Další z metabolických efektů je fosforylace a aktivace

6-fosfofrukto-2-kinázy a také translokace hexokinázy do mitochondrií. Také hraje roli ve zvýšené lipogenezi skrze fosforylaci ATP-citrát lyázy, zvyšuje transkripci GLUT1 a translokaci GLUT4 do plazmatické membrány svalových a tukových buněk. Aktivita Akt také ovlivňuje nejméně dva klíčové proteiny buněčného cyklu: p21^{Cip1/WAF1} a p27^{Kip1}. Akt fosforyluje také MDM2 a jeho lidský homolog (HDM2). Dalším efektozem Akt v rámci buněčného růstu je produkt genu tuberózní sklerózy TSC2. Jeho fosforylace pomocí Akt indukuje aktivitu mTORC1 (Elghazi *et al.*, 2006; Franke, 2008).

U nádorů byla zjištěna zvýšená exprese izoform Akt2 a Akt3. Exprese Akt2 zvyšuje motilitu buněk a metastatický potenciál. Byla také zjištěna méně se vyskytující mutace PH domény Akt1 u kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu a vaječníků. Akt působí na vimentin, girdin, N-kadherin a E-kadherin, což jsou proteiny, které stojí za vznikem a udržováním metastáz. Motilita buněk právě souvisí s reorganizací aktinového cytoskeletu, která probíhá během epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). Hyperaktivita Akt v nádorových buňkách bývá způsobována změnami receptorů růstových faktorů a Ras, kdy tyto změny chrání buňky před apoptózou. Mutace v různých izoformách Akt mohou také způsobit některé další nemoci. Mutace v Akt2 může způsobovat vznik familiárního diabetu, mutace Akt1 způsobuje dědičnou formu schizofrenie. Dysregulace aktivity Akt se projevuje také u neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba (Franke, 2008; Ersahin *et al.*, 2015).

2.4.4 PTEN

Fosfatázový a tenzinový homolog deletovaný na chromozomu 10 (PTEN, další označení MMAC1 nebo TEP1) je tumor supresorový gen lokalizovaný na dlouhém raménku v pozici 23 na lidském chromozomu 10 (10q23) (Wang *et al.*, 2001). Gen kóduje protein o délce 403 aminokyselin o molekulární hmotnosti 47 kDa nacházející se v cytoplazmě buněk (Ersahin *et al.*, 2015; Milella *et al.*, 2015). Dvě na sobě nezávislé skupiny v roce 1997 tento gen objevily a pojmenovaly ho *PTEN*, nebo také *MMAC* (*mutated in multiple advanced cancers*). PTEN byl tehdy prvním objeveným tumor supresorem, který kódoval protein s fosfatázovou aktivitou. Krystalová struktura odhalila přítomnost fosfatázové domény, C2 lipidovou membránově-vazebnou doménu a vazebný motiv třídy I PDZ na C-terminálním konci, který rozpoznává cílové proteiny (Obr. 9) (Milella *et al.*, 2015).



Obrázek 9: Lineární a 3D struktura PTEN (převzato z Worby *et al.*, 2014).
 Legenda: PDZ – vazebný motiv na C-konci, C2 – lipidově-vazebná doména, PDB/PTP – fosfatázová doména, HCxxGxxR – katalyticky aktivní místo.

PTEN funguje jako duálně specifická fosfatáza, která má proteinovou i lipidovou fosfatázovou aktivitu (Byun *et al.*, 2011). Má různé varianty, jako PTEN Long a PTEN α . PTEN Long je varianta klasického PTEN, který má sekreční sekvenci na N-konci, díky které může fungovat i mimo buňku. Byl detekován v lidské krevní plazmě a séru. PTEN α je také prodloužený na N-konci a nachází se v cytoplazmě a mitochondriích, kde je zapojen v indukci cytochromu c a produkci ATP. Některé proteiny nemusí být ovlivněny přímo katalytickou aktivitou PTEN, ale fyzickou interakcí s ním, což platí třeba pro p53, MSP58 nebo HIF1 α (Milella *et al.*, 2015).

PTEN hraje hlavní roli v regulaci zastavení buněčného cyklu a apoptózy, buněčné adheze, migrace i diferenciace. Funguje jako negativní regulátor PI3K tím, že defosforyluje fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP3), který negativně reguluje Akt buď přímo, anebo procesem, který zahrnuje fokální adhezní kinázu (FAK) (Wang *et al.*, 2001). PTEN se účastní metabolických procesů přes PI3K-dependentní i –independentní funkce. Má také důležitý vliv na buněčnou motilitu, kde se uplatňuje při chemotaktickém pohybu pomocí hladiny PIP3. PTEN defosforyluje FAK, a tím způsobuje inhibici buněčné migrace. Defosforyluje také protein se Src-homologní doménou (SHC), čímž inhibuje další downstream signální dráhy, ke kterým patří mitogenem aktivovaná proteinkinázová dráha (MAPK). Role PTEN je velice důležitá

a jeho ztráta je asociována se vznikem agresivnějších nádorů. Přímo v jádru byla objevena interakce PTEN s centromerou vázajícím specifickým proteinem C (CENP-C), který moduluje stabilitu centromery. PTEN je také zapojen v opravných procesech DNA, kde zvyšuje transkripci Rad51, což je klíčový komponent homologní rekombinace opravující dvojité zlomy DNA. PTEN také kontroluje průchod buňky buněčným cyklem pomocí snižování hladiny cyklinu D1. Reguluje také buněčnou senescenci skrz APC-CDH1 (*anaphase-promoting complex-cadherin 1*) proteinovou degradaci. Funkce PTEN je u většiny nádorů ztracena kvůli somatickým mutacím, genovému umlčování nebo epigenetickým mechanismům (Milella *et al.*, 2015).

2.4.5 PI3K signální dráha a diferenciace střevních buněk

Diferenciace střevních buněk je řízena mnoha signálními drahami, které jsou spolu propojeny. Mezi tyto dráhy patří také PI3K signální dráha. Její role v diferenciaci střevních buněk byla zjišťována u různých experimentů. V roce 2001 bylo prokázáno signifikantní ovlivnění diferenciace střevních buněk při inhibici PI3K a nárůst exprese PTEN. Diferenciace buněk z nádorových buněčných linií HT-29 a Caco-2 byla detekována pomocí specifických markerů (intestinální alkalická fosfatáza a sacharáza). Zmíněný článek poukazuje také na opačný efekt, tj. znovuzavedení nebo zvýšení exprese PI3K, která může u diferencovaných nádorových buněk způsobit jejich dediferenciaci a maligní zvrát (Wang *et al.*, 2001). Další experiment provedl Laprise *et al.* (2002). Ovlivnění diferenciace PI3K dráhou zde bylo sledováno ve spojitosti s uspořádáním buněčných spojů a cytoskeletonu (E-kadherin), které následně ovlivnily i aktivitu MAPK a p38 drah. Byla zde měřena míra fosforylace Akt na pozici serinu 473 (Ser473), která je závislá na PI3K aktivitě. Důležitost této dráhy při proliferaci a diferenciaci střevních buněk zde byla prokázána pomocí měření exprese markerů (villin a sacharáza-izomaltáza) enterocytů z buněčné linie Caco-2. Exprese markerů byla po použití inhibitoru PI3K snížena. Villin se jako strukturní protein nachází jak v mikrokličích enterocytů, tak i u dalších buněk bez kartáčového lemu. Je považován za významný marker diferenciace střevních buněk, a to i u nádorových buněk z buněčných linií. Váže na sebe fosfoinositidy, z nichž nejvíce PIP2, který se v buňce nachází jako substrát PI3K a dochází k jeho vzniku také fosfatázovou aktivitou PTEN (Khurana *et al.*, 2008). Vzájemné ovlivnění drah PI3K, MAPK a p38 pravděpodobně tedy hraje roli v diferenciaci střevních buněk (Wang *et al.*, 2001; Laprise *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2010).

PTEN, který funguje jako antagonist PI3K, je exprimován po ose krypta-klk s nejsilnější expresí v epiteliálních buňkách v lumen střeva, tj. v diferencovaných buňkách. Jako jediný tumor supresorový gen má fosfatázovou aktivitu a zpomaluje buněčný růst, způsobuje apoptózu nebo inhibuje buněčnou adhezi a migraci (Bai *et al.*, 2010). Jeho role v zastavení buněčného růstu by mohla hrát roli i u diferenciace buněk.

2.4.6 PI3K signální dráha a solubilní epoxid hydroláza

Experimentálně bylo zjištěno, že zvýšená exprese CYP epoxygenáz vede k vyšší expresi PI3K a fosforylaci Akt v endoteliálních buňkách (Yang *et al.*, 2007). Tento výsledek napovídá tomu, že CYP epoxygenázy, popř. jejich produkty EETs, stojí za udržováním nediferencovaných buněk a vyhnutí se apoptóze. Na druhou stranu, sEH by měla tuto aktivitu inhibovat a její aktivita by mohla být spojena s PTEN. Této hypotéze odpovídají výsledky Yao *et al.* (2016) a Hao *et al.* (2018), kde došlo po použití inhibitoru sEH (TPPU) k aktivaci PI3K/Akt dráhy. Spolupůsobení PTEN a sEH by tedy mohlo umožňovat diferenciaci buněk. Propojení PI3K dráhy s katalytickou aktivitou sEH není stále úplně objasněno.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístrojové vybavení

- Blotovací zařízení (Trans-Blot SD cell, Bio-Rad, USA)
- Centrifuga chlazená (MR22i, Jouan SA, Francie)
- Detekční zařízení pro Western blot (Odyssey Fc Dual-Mode, LiCor, USA)
- ELISA reader (Power Wave XS, BioTek, USA)
- Flow box (MSC-Advantage, Thermo Scientific, USA)
- Histoprocessor (Histos-Pro, Itálie)
- Inkubátor (Heracell, Thermo Scientific, USA)
- Inverzní mikroskop (Eclipse TS100, Nikon, Japonsko)
- Lednička (4 °C) s mrazákem (−20 °C) (Gorenje, Slovinsko)
- Souprava pro gelovou elektroforézu (Mini Trans-Blot cell, Bio-Rad, USA)
- Stolní centrifuga (MiniSpin, Eppendorf, Německo)
- Světelný mikroskop (BX, Olympus, Japonsko)
- Termoblok
- Třepačka
- Vodní lázeň (TW8, Julabo, Německo)
- Zdroj napětí (MP-300V, Major Science, USA)

3.2 Softwarové vybavení

- Excel (2010, Microsoft, USA)
- KC Junior (BioTek, USA)
- R program (verze 3.5.1, 2018)

3.3 Použité chemikálie

- Aceton (PENTA, ČR)
- APS (peroxodisíran amonný, Sigma Aldrich, USA)
- Butyrát sodný (B5887, Sigma Aldrich, USA)
- Destilovaná/deionizovaná voda
- Hematoxylin (Fluka, Německo)
- Chemiluminiscenční substrát (SuperSignalTM West Pico PLUS, Thermo Scientific, USA)
- Marker molekulové hmotnosti (Full Range Rainbow, Amersham, UK)

- Montovací médium (Pertex, Histolab AB, Švédsko)
- N-butanol (PENTA, ČR)
- Ponceau S (Sigma Aldrich, USA)
- Protilátka proti fosforylovanému Akt (AKT phospho SER473, GTX 28932, GeneTex, USA)
- Protilátka proti GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, myši monoklonální protilátka, Sigma Aldrich, USA)
- Protilátka proti PTEN (1B8, GTX 83304, GeneTex, USA)
- Sekundární anti-králičí protilátka (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, 7074, Cell Signaling, USA)
- Sekundární anti-myši protilátka (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody, 7076, Cell Signaling, USA)
- SDS (dodecylsírán sodný, Sigma Aldrich, USA)
- Sušené nízkotučné mléko (tuk max. 1,3 %, Laktino, ČR)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin, Sigma Aldrich, USA)
- TPPU (N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidiny]-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]urea, SML0750, Sigma Aldrich, USA)
- Xylen (PENTA, ČR)

3.3.1 Soupravy

- Mouse/Rabbit PolyDetector DAB HRP Brown kit (cat. no. BSB 0205, Bio SB, USA)
- Pierce Colorimetric In-Cell ELISA Kit (62200, Thermo Scientific, USA)

3.3.2 Roztoky

- Akrylamid/bisakrylamid vodný roztok (30%).
- Bradfordovo činidlo: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rozpustit ve 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné, doplnit do 100 ml destilovanou vodou, uchovávat ve tmě při 4 °C.
- BSA (1%): 1 g hovězího sérového albuminu (BSA) v PBS.
- Citrátový pufr (pH 6,0): 9 ml 10mM kyseliny citrónové, 41 ml 10mM citronanu sodného a 450 ml vody.
- Čpavková voda (hydroxid amonný a voda).

- DMEM (10%): Dulbecco's Modified Eagle Medium (D6171, Sigma Aldrich, USA) obsahuje 10 % fetálního bovinního séra (FBS, SV30160.03, Hyclone, USA), 1 % GlutaMAXu (Thermo Scientific, USA), 100 U/ml penicilinu, 100 mg/ml streptomycinu, 1 % pyruvátu sodného).
- DMSO (10%): dimethylsulfoxid (WAK-Chemie Medical GmbH, Německo) ve sterilní destilované vodě.
- Elektroforetický pufr: 3 g Tris-base, 14,4 g glycinu, 10 ml 10% SDS a doplnit na 1 l destilovanou vodou.
- Ethanol (96%): Ethanol ve vodě.
- Nanášecí (loadovací) pufr (pH 6,8): 4% SDS, 10% 2-merkaptoethanol, 20% glycerol, 0,004% bromfenolová modř a 0,125M Tris-HCl.
- Paraformaldehyd (4%): Paraformaldehyd v PBS.
- PBS pufr (1x): 10x PBS do destilované vody.
- RIPA pufr: 1,66 ml 50mM Tris-HCl (pH 8,0), 7,5 ml 1M roztoku 150mM NaCl, 0,5 ml zásobního roztoku 1% NP-40, 5 ml 5% roztoku 0,5% deoxycholátu sodného, 0,5 ml 10% roztoku 0,1% SDS, 34,84 ml destilované vody, 2 tbl completeMini a 3tbl PhosphoSTOP. Rozpustit na třepačce (cca 15 min a alikvoty se zmrazí na -20°C).
- TBS pufr (1x): 10x TBS do destilované vody.
- Transferový pufr: 3g Tris-base, 14,4 g glycinu, 200 ml methanolu a doplnit do 1 l destilovanou vodou.
- Tris-HCl (0,5M a 1,5M, pH 8,8): Tris base, destilovaná voda, úprava pH pomocí HCl.
- Tris/Tween pufr (0,05%): 0,5M Tris pufr (pH 7,6) a Tween-20 (500 μl /l).
- Trypsin (0,25%): trypsin v EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová).
- Tween (20%): Tween-20 s destilovanou vodou (100 mg/ml).

3.4 Biologický materiál

Pro všechny metody byly použity buňky buněčné linie HT-29 odvozené od adenokarcinomu lidského tlustého střeva (American Type Culture Collection, USA), která byla autentizována pomocí STR profilu na Ústavu klinické genetiky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

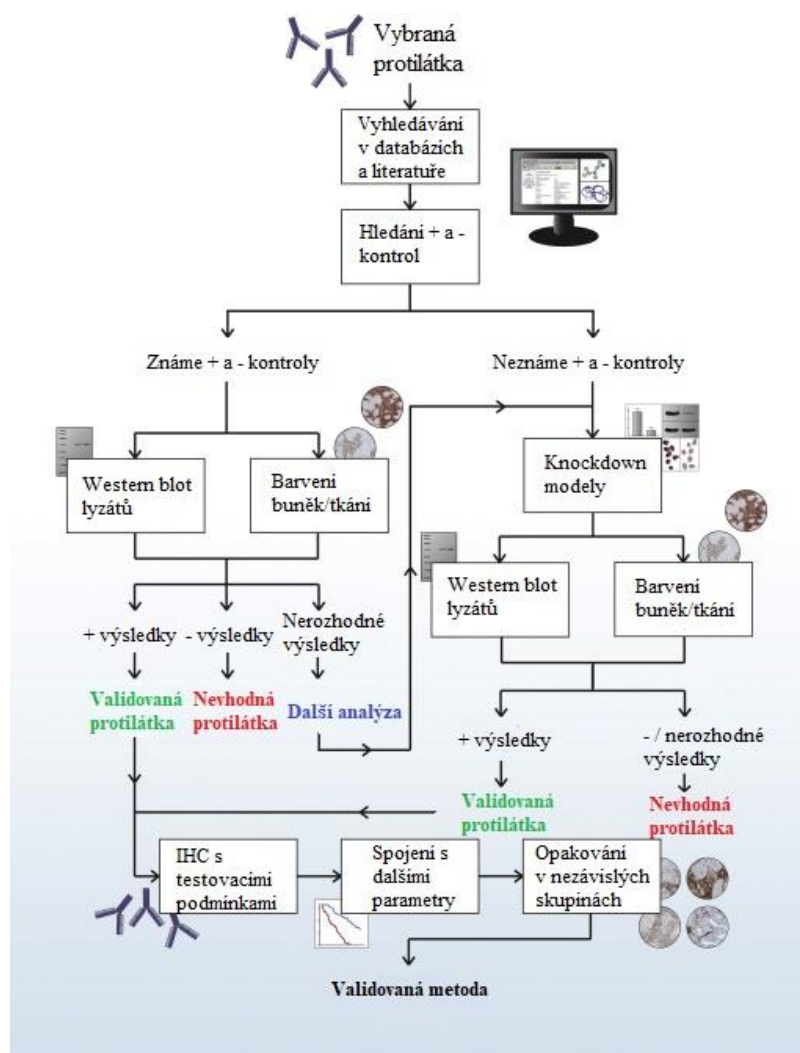
3.5 Metody

3.5.1 Kultivace buněk

Buňky HT-29 byly kultivovány za standardních podmínek (5% CO₂, 37 °C) v inkubátoru. Pasáž byla prováděna dvakrát týdně. Pro kultivaci bylo používáno médium DMEM obsahující 10 % FBS, GlutaMAX, pyruvát sodný, penicilin a streptomycin. Pasážování se provádělo po dosažení konfluence. Z kultivační láhve se odsálo staré médium, buňky se omyly 1x PBS a poté byly inkubovány 5 min v inkubátoru s roztokem trypsinu v EDTA. Reakce byla zastavena přidáním 9 ml média, kterým se buňky smyly z povrchu láhve. V kultivační láhvi se nechal 1–2 ml suspenze buněk, ke kterému se přidalo 15 ml nového kultivačního média. Pro diferenciaci buněk byl přidán do kultivačního média vždy čerstvý roztok 5mM butyrátu sodného (NaBt, v 10% DMSO se sterilní destilovanou vodou) po dobu 72 hod (Čížková *et al.*, 2019).

3.5.2 Optimalizace protilátek

Před provedením vlastního experimentu bylo třeba optimalizovat ředění použitých primárních protilátek proti fosforylovanému Akt (pAkt) a PTEN. Protože se jednalo o nově pořízené primární protilátky, bylo třeba také ověřit, že detekují správný produkt pomocí metody Western blot, čili zda detekuje jeden proužek o správné molekulové hmotnosti a pomocí imunocytochemického barvení zjistit, zda protilátka detekuje antigen v předpokládané subcelulární lokalizaci. Následně bylo nutné ověřit, jestli je použitelná pro metodu In-Cell ELISA, neboť tato metoda nepatří mezi výrobcem vyzkoušené metody. Schéma procesu hledání optimálních protilátek podle O'Hurley *et al.* (2014) je uvedeno níže na obrázku (Obr. 10).



Obrázek 10: Doporučený proces validace protilátek pro využití u dalších metod (upraveno dle O'Hurley *et al.*, 2014). Legenda: + pozitivní, - negativní.

3.5.2.1 Příprava vzorků pro Western blot

K buněčné peletě, která se udržovala na ledu, se přidalo 100 µl čerstvého RIPA pufru, mikrozkuhavka se protřepala a poté se 20 min nechala na ledu na třepačce při 120 rpm (otáčky za minutu). Po protřepání se buněčná suspenze nechala odstředit v centrifuze po dobu 15 min při 15000 rpm a 4 °C. Odebraný supernatant obsahoval vyizolované proteiny a dále se uchovával při –80 °C.

3.5.2.2 Bradfordova metoda

Bradfordova metoda (Bradford, 1976) byla využita pro stanovení koncentrace proteinů v získaných vzorcích. Pomocí kalibrační řady byla stanovena kalibrační křivka, ze které bylo možné odečíst neznámé množství proteinu ve vzorcích. Do mikrotitrační destičky byly v doubletech pipetovány destilovaná voda, BSA (hovězí sérový albumin) a Bradfordovo činidlo (Tab. 1).

Tabulka 1: Kalibrační řada pro Bradfordovu metodu. Legenda: H₂O – destilovaná voda, BSA – hovězí sérový albumin, Bradf. – Bradfordovo činidlo.

	0	1	2	3	4	5	6
H ₂ O [μl]	10	9	8	7	6	5	4
BSA [μl]	0	1	2	3	4	5	6
Bradf. [μl]	200	200	200	200	200	200	200

Dále byl do mikrotitrační destičky pipetován vzorek, rovněž v doubletu, a to v objemu 1 μl s 9 μl vody a 200 μl Bradfordova činidla. Vzorky v destičce se nechaly 10 min inkubovat při RT (room temperature ~ 20 °C) a poté byla měřena absorbance při 595 nm vlnové délky v programu KC Junior (BioTek, USA). Ze vzniklé kalibrační křivky byla určena pomocí Excelu (2010, Microsoft, USA) rovnice lineární regrese, díky které bylo vypočítáno množství proteinu ve vzorku, který byl dále používán pro Western blot.

3.5.2.3 Western blot

Western blot nebo také imunoblot je metoda založená na separaci určitého proteinu ze směsi a jeho následné detekci. Při této metodě se používá postup skládající se ze tří kroků: elektroforetická separace proteinů, přenesení na membránu a detekce proteinů (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981). Separace proteinů se provádí pomocí SDS-PAGE, kdy SDS (dodecylsulfát sodný) propůjčí molekulám proteinů stejný záporný náboj a separace podle molekulové hmotnosti probíhá za použití polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE).

Ethanolem vyčištěná skla se umístila do stojánku a připravil se separační gel. Pro přípravu dvou 10% gelů se smíchaly 4 ml deionizované vody, 3,3 ml 30% akrylamid/bisakrylamid roztoku, 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 100 μl 10% SDS, 100 μl APS a 4 μl TEMED. Gel se napipetoval mezi skla a převrstvil N-butanolem.

Po ztuhnutí gelu se N-butanol odstranil. Poté se připravil 5% koncentrační gel smícháním 3 ml deionizované vody, 700 μ l 30% akrylamid/bisakrylamid roztoku, 1,25 ml 0,5M Tris-HCl s 0,4% SDS (pH 8,8), 25 μ l 10% APS a 20 μ l TEMED. Koncentrační gel se napipetoval mezi skla a do něj se umístil hřebínek. Stojánky s gely se vložily do elektroforetické vany, která se vyplnila elektroforetickým pufrem. Vzorek (vyizolované proteiny) se smíchal s nanášecím (loadovacím) pufrem (1:1). Tato směs se promíchala na třepačce (vortexu) a vložila na 1 min do termobloku (95 °C). Do jamek v gelu se napipetovaly 2 μ l markeru molekulové hmotnosti a vzorky s nanášecím pufrem. Elektroforetická vana se uzavřela a na 120 min připojila ke zdroji napětí (110 V).

Po provedení separace se gely vyjmuly z komůrky, odřízl se koncentrační gel a separační gel se oplachoval 30 min v transferovém pufru na třepačce. Do transferového pufru se namáčela také membrána a filtrační blotovací papír. Desky blotu bylo třeba navlhčit transferovým pufrem a odspodu nahoru se pokládal na blot filtrační blotovací papír, membrána, gel a opět filtrační blotovací papír. Blot se uzavřel víkem a připojil na 50 min ke zdroji napětí (10 V). Po přenosu se membrána opláchla v destilované vodě, barvila 5 min v Ponceau S a opět se opláchla destilovanou vodou.

Pro blokování nespecifických interakcí se membrána omývala na třepačce 1 hod v 5% roztoku nízkotučného mléka (2,5 g sušeného mléka, 50 ml 1x PBS a 45 μ l Tween-20). Dále se naředily primární protilátky proti pAkt (1:100, 1:200), PTEN (1:1000, 1:2000) a jako pozitivní kontrola protilátka proti GAPDH (1:10000, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) a inkubovaly se na membráně ve vlhké komůrce přes noc při 4 °C. Ředění pro primární protilátky pAkt a PTEN vycházelo z doporučení výrobce protilátek. Pak se membrána opět 1 hod promývala v 1x PBS, který se v průběhu promývání měnil za čerstvý. Dále se naředila sekundární protilátka. Anti-myší protilátka (pro GAPDH a PTEN) v poměru 1:6000 do roztoku nízkotučného mléka bez Tweenu a anti-králičí (pro pAkt) v poměru 1:5000. Sekundární protilátka se na membráně inkubovala 1 hod při RT. Poté se membrána 1 hod promývala v 1x PBS s Tween-20. Na membránu se aplikoval chemiluminiscenční substrát a nechal se inkubovat 5 min ve tmě. Substrát se okapal a membrána se vložila do detekčního přístroje LiCor, ve kterém se provedlo vyhodnocení chemiluminiscence.

3.5.2.4 In-Cell ELISA

Pro určení správného ředění protilátek pAkt a PTEN pro metodu In-Cell ELISA byla provedena optimalizace. Díky In-Cell ELISA je možné kvantifikovat proteiny a další látky uvnitř buněk pomocí enzymové imunochemické reakce (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*, Van Weemen *et* Schuurs, 1971). Před samotným provedením byly buňky HT-29 vysazeny do 96jamkové mikrotitrační destičky v počtu 10000 buněk na jamku ve 100 μ l kultivačního média (DMEM) do doubletů. Buňky byly fixovány 4% paraformaldehydem v TBS (100 μ l/jamka) 15 min při RT.

Paraformaldehyd se odstranil z destičky a buňky se dvakrát opláchly 1x TBS (100 μ l/jamka). Permeabilizační pufr se připravil ředěním (101x) Surfact-AmpsTM X-100 Detergentu do 1x TBS. Permeabilizační pufr (100 μ l/jamka) se po odstranění 1x TBS z destičky nechal inkubovat 15 min při RT. Poté se pufr odstranil a provedl oplach 1x TBS. Připravil se Quenching solution (1% peroxid vodíku v 1x TBS). Po odstranění 1x TBS se přidal Quenching solution (100 μ l/jamka) a nechal inkubovat 20 min při RT. Po odstranění Quenching solution a oplachu 1x TBS se do destičky přidal Blocking Buffer (100 μ l/jamka) a nechal se inkubovat 60 min při RT.

Primární protilátky (anti-pAkt, anti-PTEN) se ředily do diluentu, který obsahoval Blocking Buffer a oplachovací pufr (7,5 ml 20x TBS, 141 ml destilovaná H₂O, 1,5 ml Surfact-Amps 20 Detergent) v poměru 1:1. Primární protilátka anti-PTEN se ředila v poměrech 1:1000, 1:1500, 1:2000 a 1:5000. Primární protilátka anti-pAkt byla ředěna v poměrech 1:50, 1:100, 1:250 a 1:500. Pro samotný experiment (tj. sledování vlivu TPPU na expresi pAkt a PTEN) bylo použito pouze jedno nejvhodnější ředění (viz Výsledky). Po odstranění Blocking Bufferu z destičky se přidaly primární protilátky (50 μ l/jamka), pro negativní kontroly pouze diluent protilátek. Destička se zalepila originální páskou a nechala inkubovat přes noc při 4 °C. Po odstranění primárních protilátek se buňky opláchly (100 μ l/jamka) třikrát oplachovacím pufr. Oplachovací pufr se odstranil, přidala se ředěná (400x) sekundární protilátka (HRP Conjugate, 100 μ l/jamka) v oplachovacím pufru a nechala se inkubovat 30 min při RT. Po odstranění sekundární protilátky se provedl třikrát oplach pufr (200 μ l/jamka). Poté se přidal TMB substrát (100 μ l/jamka) a nechal se inkubovat ve tmě 15 min při RT. K substrátu se poté přidal TMB Stop Solution (100 μ l/jamka) a měřila se absorbance při vlnové délce 450 nm v programu KC Junior. Roztoky se odstranily z destičky a ta se dvakrát opláchla destilovanou vodou (200 μ l/jamka). Poté se do jamek přidala Janus Green Whole-Cell Stain (100 μ l/jamka)

a nechala se inkubovat 5 min při RT. Barvivo se odstranilo a destička se třikrát opláchla destilovanou vodou. Poté se k buňkám přidal Elution Buffer (100 μ l/jamka), nechal se inkubovat 10 min při RT a změřila se absorbance při vlnové délce 615 nm.

Ze získaných absorbancí při vlnové délce 450 nm pro negativní kontroly se vypočítal aritmetický průměr a tato hodnota se odečetla od naměřených absorbancí při 450 nm pro ovlivněné buňky. Poté se hodnoty absorbance při 450 nm normalizovaly na absorbanci při 615 nm (vydělením těchto hodnot pro každou jamku). U doubletů pro jednotlivá ovlivnění se vypočítal aritmetický průměr a poté se určila fold change (změna) jako poměr hodnota absorbance pro diferencované a nediferencované buněk (ovlivnění a kontrola).

3.5.2.5 Imunocytochemické barvení

Imunocytochemické barvení je metoda barvení buněk, které jsou rozetřeny a fixovány na podložním sklíčku (Coons *et al.*, 1942). U těchto buněk je detekována subcelulární lokalizace proteinů na základě jejich vazby ke specifickým primárním protilátkám a jejich barevná detekce pomocí sekundární protilátky a chromogenu. Diferencované a nediferencované buňky HT-29 byly rozetřeny na podložní sklíčka ve formě suspenze kapky (2,5 μ l), která se nechala vypařit. Poté byly 10 min fixovány pomocí 4% paraformaldehydu v PBS a skladovány při -20 °C.

Vzorky se oplachovaly vodou po dobu 5 min. Před barvením bylo nutné provést permeabilizaci pufrém (101x ředění Surfact-AmpsTM X-100 Detergentu do 1x TBS), 30 μ l po dobu 15 min při RT. Vzorky se pak oplachovaly vodou 5 min. Poté se provedlo odkrytí antigenů pomocí histoprocesoru, ve kterém byly vzorky ponořeny v citrátovém pufru (pH 6,0) a byly zahřívány na teplotu 120 °C po dobu 15 min. Poté se vzorky oplachovaly vodou 5 min. Dále se provedlo blokování endogenní peroxidázy pomocí roztoku 1% H₂O₂ po dobu 10 min. Poté se provedl oplach vodou a oplach Tris/Tween pufrém 5 min. Dále se provedlo blokování nespecifických interakcí ProteinBlockem po dobu 10 min. Na vzorky se poté aplikovaly primární protilátky proti pAkt a PTEN ředěné Dako Antibody diluentem. Pro pAkt byla ředění 1:50 a 1:100, pro PTEN 1:50, 1:100 a 1:200. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C.

Další den se vzorky oplachovaly dvakrát 5 min Tris/Tween pufrém. Vizualizace reakce byla provedena pomocí Mouse/Rabbit PolyDetector DAB HRP Brown kit. Roztok chromogenu DAB (součást kitu) byl aplikován po dobu 5 min. Vzorky se dobarvily hematoxylinem po dobu 6 min, opláchly vodou a čpavkovou vodou,

oba oplachy trvající 5 min. Dále se provedlo odvodnění a projasnění 96% ethanolem, acetonem, aceton/xylenem, xylenem 1 a xylenem 2, každý krok trvající 5 min. Zamontování na trvalý preparát se provedlo pomocí montovacího média Pertex (epoxidová pryskyřice). Preparáty pak byly hodnoceny ve světelném mikroskopu.

3.5.3 Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy TPPU

Role sEH byla testována pomocí inhibitoru sEH se zkratkou TPPU. Inhibitor se aplikoval na buňky ve dvou koncentracích (1 μ M a 10 μ M) na buňky diferencované a nediferencované. Diferenciace buněk byla indukována chemicky 5mM roztokem butyrátu sodného (NaBt). Nediferencované a diferencované buňky byly ovlivňovány v doubletech a následně se detekoval pAkt a PTEN.

Nediferencované buňky adherovaly 24 hod k mikrotitrační destičce v množství 10000 buněk/jamka v objemu 80 μ l a poté na ně bylo aplikováno 20 μ l roztoku inhibitoru sEH (TPPU) a negativní kontrola (0,1% DMSO). Požadované koncentrace DMSO a TPPU bylo dosaženo ředěním zásobních roztoků látek do média. Zásobní roztoky měly vždy 5x vyšší koncentraci než v jamce po rozpipetování. Zásobní roztok TPPU měl koncentraci 25mM a byl připraven rozpuštěním inhibitoru v DMSO. Pro jednotlivá ředění, která se aplikovala na buňky, bylo třeba zásobní roztok předředit 25x (1mM) v kultivačním médiu.

Diferencované buňky byly vysazeny obdobně, po 24 hodinách na ně byl však aplikován 5mM NaBt, se kterým se buňky nechaly inkubovat 72 hod za standardních podmínek. Po 72 hod bylo z jamek odsáto médium s NaBt, přidáno 80 μ l čerstvého média a byl aplikován TPPU ve stejném schématu jako u buněk nediferencovaných, a negativní kontrola (Tab. 2).

Tabulka 2: Aplikace kontroly a inhibitoru sEH (TPPU) na nediferencované a diferencované buňky HT-29 v doubletech. Buňky byly vysety v objemu 80 μ l média a přidávalo se k nim 20 μ l roztoku inhibitoru/kontroly.

Předředěný zásobní roztok [μ l]		Médium [μ l]	K buňkám přidat [μ l]	Finální koncentrace v jamce
0,5% DMSO	0,2	40	20	0,1% DMSO
5 μ M TPPU	0,2	40	20	1 μ l TPPU
50 μ M TPPU	2,1	40	20	10 μ l TPPU

3.5.3.1 In-Cell ELISA

Metoda In-Cell ELISA byla použita pro detekci změn exprese proteinů po použití TPPU ve dvou různých koncentracích. Metoda byla provedena na buňkách HT-29 vysazených do 96jamkových mikrotitračních destiček a inhibitor TPPU byl aplikován na nediferencované buňky a buňky diferencované pomocí butyrátu sodného. Detailní popis postupu je uveden na stranách 35–36. Jediná změna je v použití konkrétního ředění primárních protilátek pAkt a PTEN, které byly pro pAkt 1:500 a pro PTEN 1:2000.

3.5.4 Statistické vyhodnocení

Změny exprese proteinů pAkt a PTEN, které byly měřeny metodou In-Cell ELISA, byly vyhodnocovány pomocí jednovýběrového t-testu s hladinou signifikance $P < 0,05$. Výpočet t-testu byl prováděn v softwaru R (verze 3.5.1).

4 VÝSLEDKY

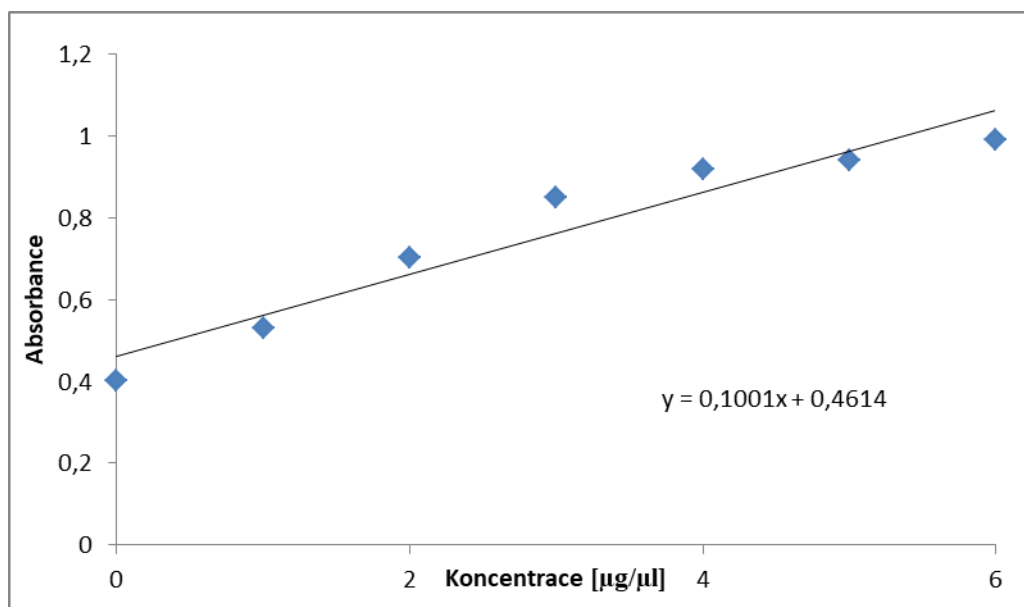
4.1 Optimalizace protilátek

Optimalizací protilátek se zjišťovalo vhodné ředění primárních protilátek proti pAkt a PTEN. Pro ověření exprese a subcelulární lokalizace sledovaných proteinů byly použity metody Western blot a imunocytochemické barvení. Následně byla ověřena vhodnost a optimální ředění primárních protilátek pro In-Cell ELISu.

4.1.1 Western blot

4.1.1.1 Bradfordova metoda

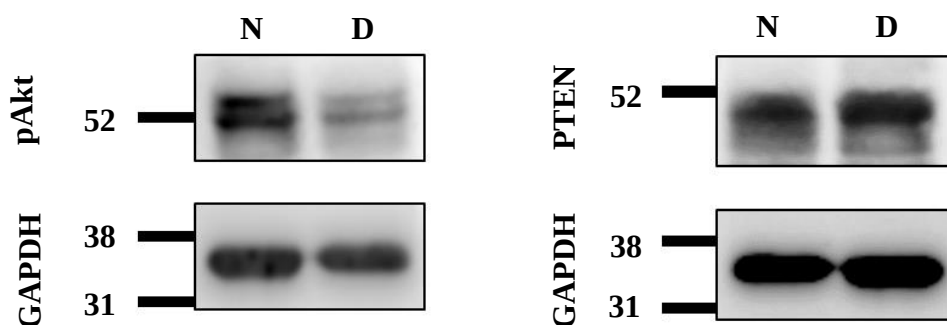
Bradfordova metoda byla použita pro zjištění koncentrace vyizolovaných proteinů z nediferencovaných a diferencovaných buněk linie HT-29. Byla vytvořena koncentrační řada pomocí hovězího sérového albuminu (BSA) a měřena absorbance při 595 nm. Pomocí Excelu byla zkonstruována kalibrační křivka a vypočítána rovnice lineární regrese (Obr. 11). Kalibrační řada se skládala z průměrů dvou hodnot absorbance pro jednu koncentraci. Pro BSA to byly hodnoty od 0,401 do 0,99 při 0–6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Měřené vzorky buněk HT-29 nediferencovaných a diferencovaných měly průměry absorbance pro nediferencované 1,689 (10,574 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a diferencované 1,423 (9,606 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).



Obrázek 11: Kalibrační křivka BSA (hovězího sérového albuminu) získaná Bradfordovou metodou a rovnice lineární regrese pro výpočet koncentrace vzorků.

4.1.1.2 Western blot

Pro stanovení exprese proteinů a vhodného ředění primárních protilátek byl proveden Western blot s ředěními pro protilátku proti pAkt 1:100 a 1:200, a pro protilátku proti PTEN 1:1000 a 1:2000. Výsledky byly detekovány pomocí detekčního zařízení LiCor. Pomocí Western blotu byla potvrzena exprese proteinů v diferencovaných i nediferencovaných buňkách (Obr. 12). Byl detekován proužek v oblasti odpovídající předpokládané molekulové hmotnosti sledovaných proteinů, tj. přibližně 47 kDa pro PTEN a 60 kDa pro pAkt. Jako vhodné ředění primárních protilátek pro metodu Western blot bylo stanoveno 1:100 pro protilátku proti pAkt a 1:2000 pro protilátku proti PTEN. Jako kontrola byla provedena detekce protilátkou proti glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáze (GAPDH).



Obrázek 12: Detekované proteiny pAkt a PTEN v buňkách HT-29 metodou Western blot. Legenda: N – nediferencované buňky, D – diferencované buňky, GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, hodnoty markeru hmotnosti v kilodaltonech [kDa].

4.1.2 In-Cell ELISA

Pomocí metody In-Cell ELISA byla provedena optimalizace primárních protilátek pAkt v ředěních 1:50, 1:100, 1:250 a 1:500. Jako vhodné ředění bylo zvoleno 1:500 (Tab. 3). Pro PTEN byla použita ředění 1:1000, 1:1500, 1:2000 a 1:5000. Jako nejvhodnější ředění bylo zvoleno 1:2000 (Tab. 4). Jako kontrola byly použity nediferencované buňky HT-29.

Tabulka 3: Absorbance při vlnové délce 450 nm a různých ředěních pro primární protilátku proti pAkt. Legenda: N – nediferencované buňky, D – diferencované buňky.

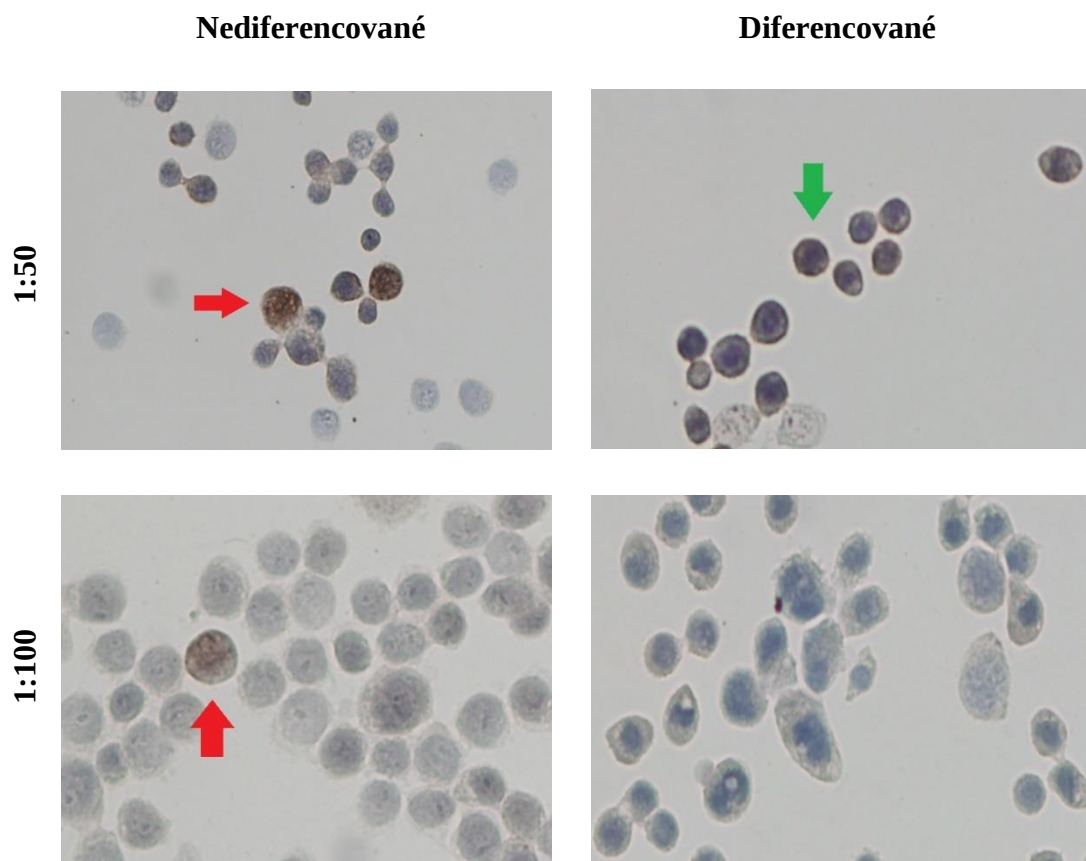
	N	N	D	D
Negativní kontrola	0,205	0,161	0,148	0,098
1:50	0,986	1,021	0,342	0,294
1:100	0,800	0,536	0,312	0,243
1:250	0,676	0,478	0,289	0,193
1:500	0,460	0,359	0,219	0,165

Tabulka 4: Absorbance při vlnové délce 450 nm a různých ředění pro primární protilátku proti PTEN. Legenda: N – nediferencované buňky, D – diferencované buňky.

	N	N	D	D
Negativní kontrola	0,201	0,205	0,106	0,120
1:1000	0,651	0,539	0,239	0,224
1:1500	0,641	0,700	0,412	0,43
1:2000	0,641	0,569	0,313	0,272
1:5000	0,458	0,665	0,255	0,254

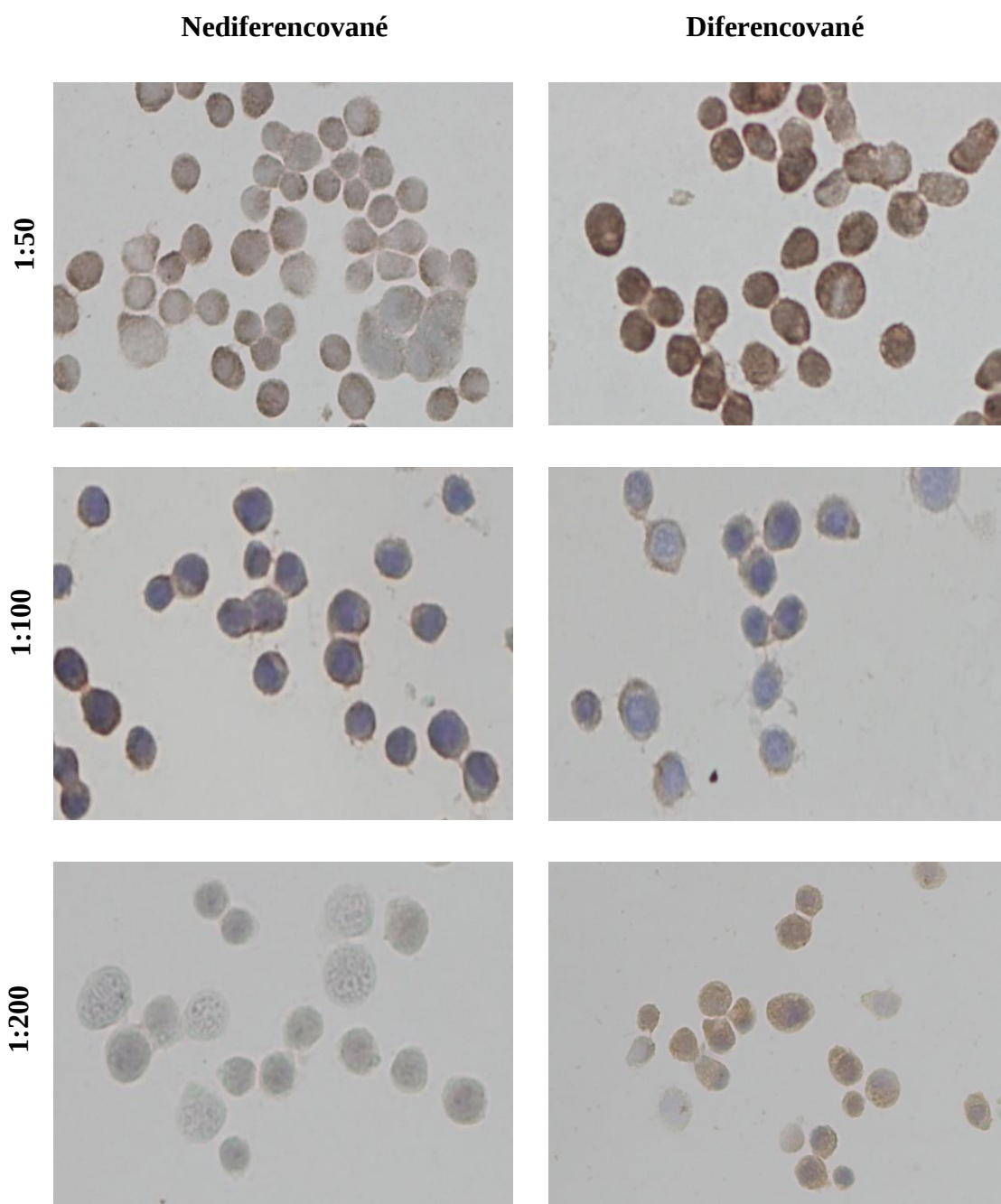
4.1.3 Imunocytochemické barvení

Pomocí barvení byly detekovány proteiny pAkt a PTEN v buňkách HT-29. Použitá primární protilátka rozeznává protein Akt fosforylovaný na serinu na pozici 473 (Ser473). Akt fosforylovaný v této pozici je aktivní a vstupuje z cytoplazmy do jádra, kde řídí genovou expresi (Martelli *et al.*, 2012). Byla detekována přítomnost pAkt v cytoplazmě i v jádře při použití ředění 1:50 a 1:100 (Obr. 13). Porovnáním obou signálů bylo vhodným ředěním zvoleno 1:50.



Obrázek 13: Výsledky optimalizace primární protilátky proti pAkt v ředěních 1:50 a 1:100 u nediferencovaných a diferencovaných buněk HT-29 (zvětšení 200x).
 Legenda: červená šipka – pozitivní jádro, zelená šipka – pozitivní cytoplazma.

PTEN je protein vyskytující se v plazmatické membráně a cytoplazmě (Stumpf *et al.*, 2016). Pomocí barvení byla detekována jeho přítomnost v cytoplazmě, což odpovídá jeho předpokládané subcelulární lokalizaci. Pro optimalizaci byla vybrána ředění 1:50, 1:100 a 1:200. Podle obrázků je zřejmé, že zvyšujícím se ředěním slábne signál PTEN a byla potvrzena vyšší exprese v diferencovaných buňkách (Obr. 14). Porovnáním těchto signálů bylo za vhodné ředění zvoleno 1:50. U diferencovaných buněk je patrná silnější intenzita barvení, což odpovídá předpokladu, že u diferencovaných střevních buněk se exprese PTEN zvyšuje (Wang *et al.*, 2001).



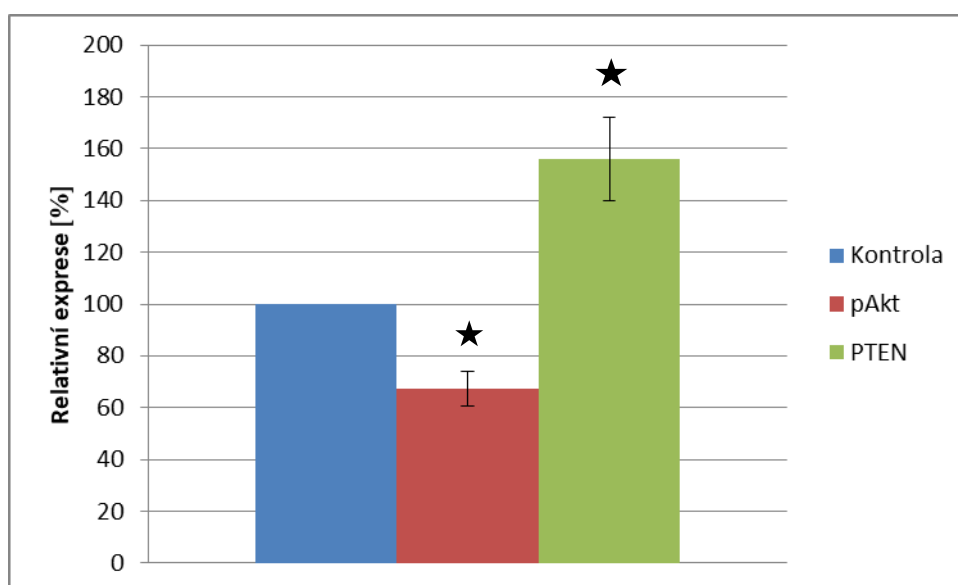
Obrázek 14: Výsledky optimalizace primární protilátky proti PTEN v ředěních 1:50, 1:100 a 1:200 u nediferencovaných a diferencovaných buněk HT-29 (zvětšení 200x).

4.2 Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy TPPU

Po optimalizaci protilátek proti pAkt a PTEN se prováděla metoda In-Cell ELISA s vybranými ředěními primárních protilátek pro buňky ovlivněné inhibitorem TPPU. Buňky ovlivňované inhibitorem byly diferencované nebo nediferencované.

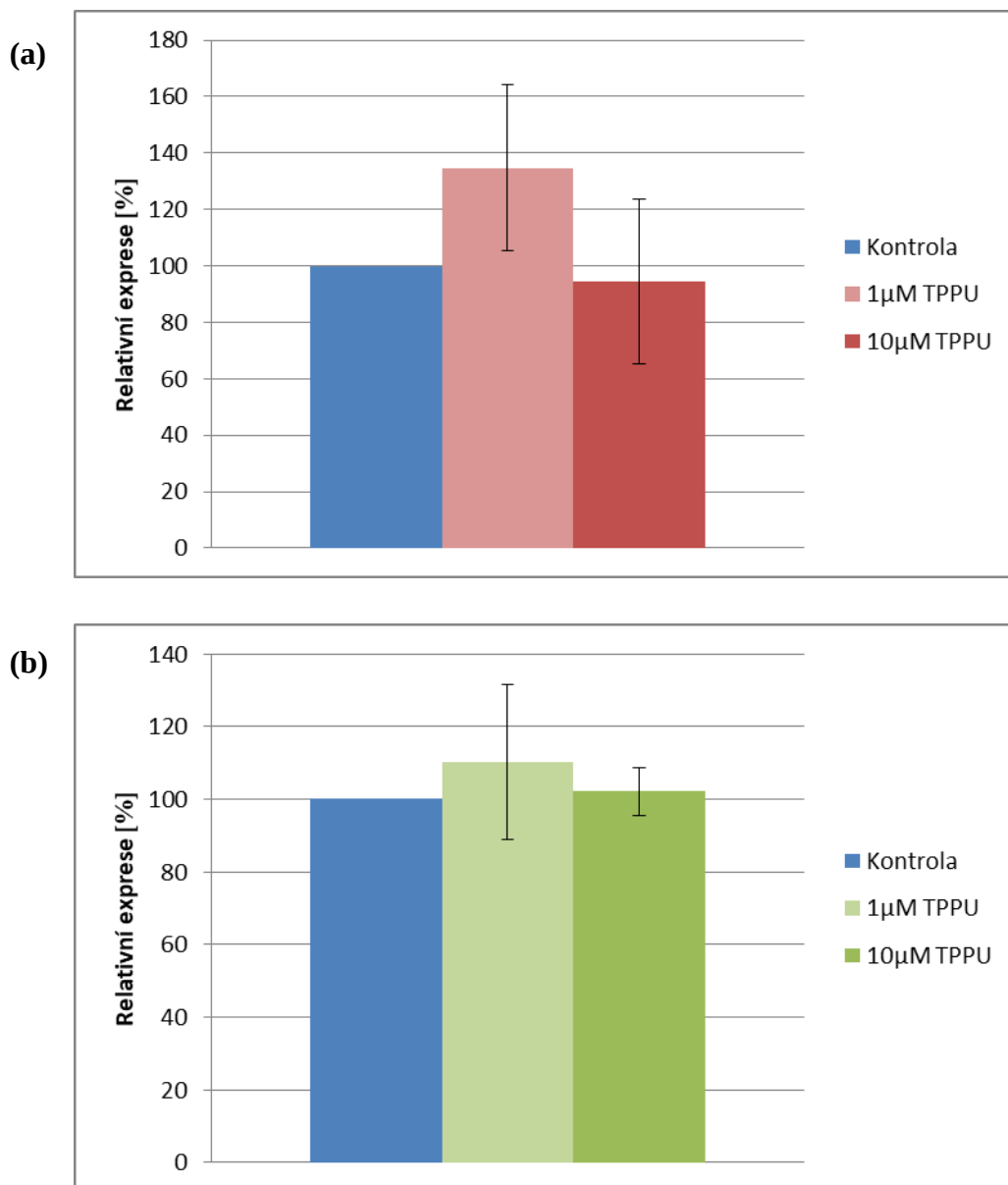
4.2.1 In-Cell ELISA

Metoda In-Cell ELISA byla prováděna stejně jako při optimalizaci primárních protilátek, s použitím nediferencovaných a diferencovaných buněk ovlivněných dvěma koncentracemi inhibitoru TPPU. Primární protilátky byly použity ve svých vybraných ředěních, tj. proti pAkt 1:500 a proti PTEN 1:2000. Při diferenciaci butyrátem sodným v koncentraci 5 mM byla prokázána signifikantně snížená relativní exprese pAkt 67,36 % ($P = 0,002$) a signifikantně vyšší exprese PTEN 156,12 % ($P = 0,006$) (Obr. 15).



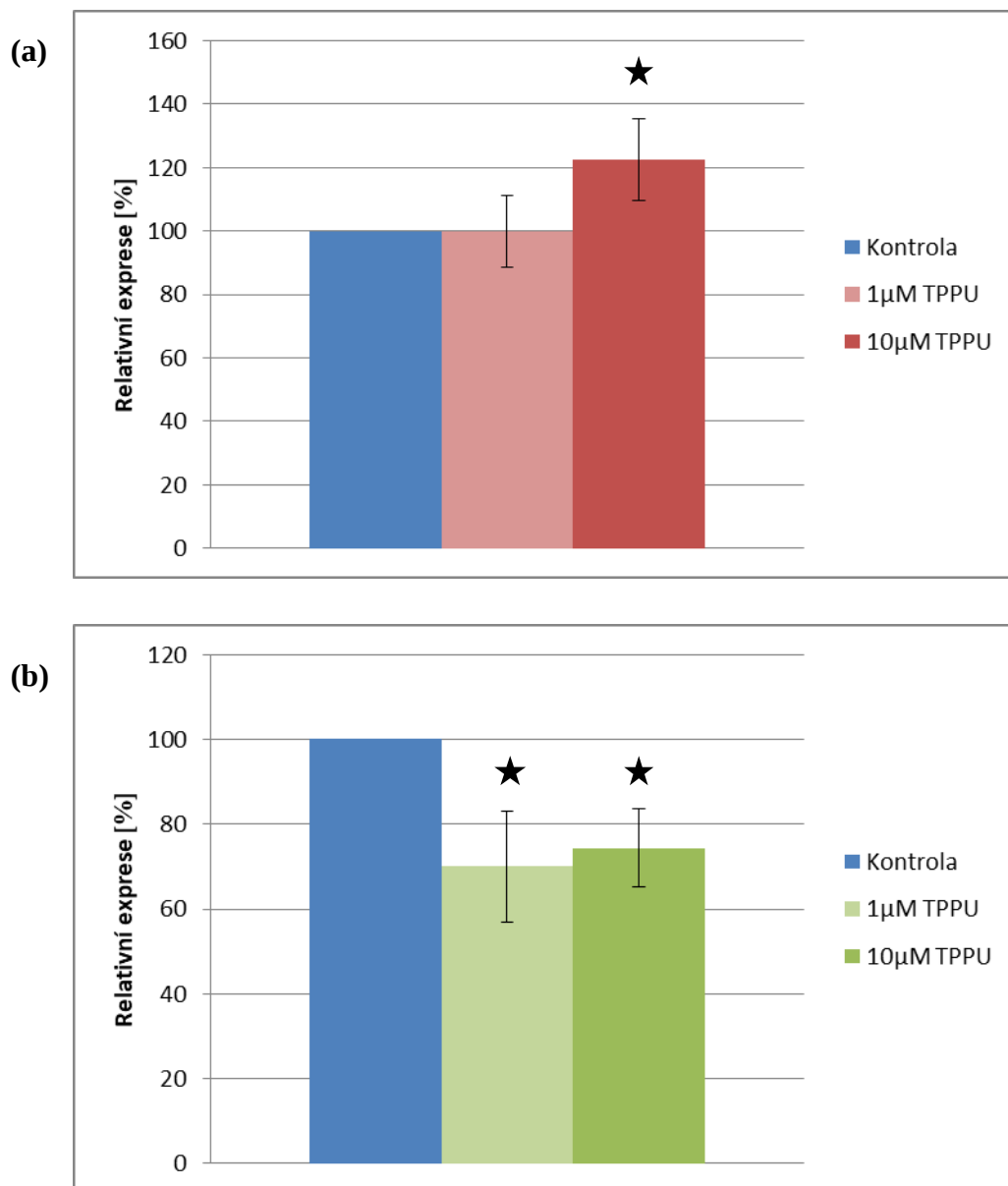
Obrázek 15: Relativní exprese proteinů pAkt a PTEN v diferencovaných buňkách HT-29 (5mM NaBt). Data jsou vyhodnocena jako průměr $\pm$ SD ze čtyř nezávislých pokusů. Statisticky signifikantní výsledky jsou označeny symbolem hvězdy ($P < 0,05$).

U nediferencovaných buněk HT-29 ovlivněných 1 μ M TPPU bylo měřeno zvýšení relativní exprese pAkt (134,7 %), u ovlivněných 10 μ M TPPU bylo měřeno mírné snížení relativní exprese pAkt (94,4 %) (Obr. 16a). Oba výsledky ale nejsou statisticky významné ($P = 0,099$; $P = 0,728$). Exprese PTEN byla po použití obou koncentrací TPPU zvýšená (110,25 %; 102,1 %), ale opět statisticky nevýznamně ($P = 0,405$; $P = 0,576$) (Obr. 16b).



Obrázek 16 (a, b): Relativní exprese proteinů pAkt **(a)** a PTEN **(b)** u nediferencovaných buněk HT-29 po ovlivnění TPPU (1µM a 10µM). Data jsou vyhodnocena jako průměr ± SD ze čtyř nezávislých pokusů.

U diferencovaných buněk HT-29 bylo měřeno drobné snížení exprese pAkt po ovlivnění 1µM TPPU (99,97 %) a zvýšení exprese po ovlivnění 10µM TPPU (122,39 %). Statisticky významná změna je po 10µM TPPU ($P = 0,04$) (Obr. 17a). Změna exprese PTEN byla u diferencovaných buněk po ovlivnění oběma koncentracemi TPPU signifikantně snížena na 70,05 % ($P = 0,019$) a 74,4 % ($P = 0,011$) (Obr. 17b).



Obrázek 17 (a, b): Relativní exprese proteinů pAkt **(a)** a PTEN **(b)** u diferencovaných buněk HT-29 po ovlivnění TPPU (1µM a 10µM). Data jsou vyhodnocena jako průměr ± SD ze čtyř nezávislých pokusů. Statisticky signifikantní výsledky jsou označeny symbolem hvězdy ($P < 0,05$).

5 DISKUZE

Signální dráhy a fyziologické pochody v organismu jsou neodmyslitelně spojeny, stejně jako jejich poruchy hrající roli v řadě různých onemocnění. Tyto dráhy však mohou být ovlivňovány různými faktory v těle i z vnějšku. PI3K dráha patří k hlavním signálním dráhám ovlivňujícím proliferaci a apoptózu buněk. V této práci byl zkoumán vliv solubilní epoxid hydrolázy (sEH) na signální dráhu PI3K ve střevních buňkách. Konkrétně se jednalo o změny v expresi fosforylovaného Akt (pAkt) a PTEN způsobené inhibicí sEH.

Primární protilátky použité v této práci nebyly výrobcem přímo určené pro In-Cell ELISu. Proto bylo třeba nejprve otestovat jejich vhodnost, protože výsledky mohly být také ovlivněny výběrem primárních protilátek (proti pAkt a PTEN). Doporučovaná validace protilátek (Baker, 2020) proběhla několika metodami, kterými bylo optimalizováno ředění pro konkrétní protilátku i konkrétní metodu. Nebyla však vyloučena mezireaktivita, variabilita konkrétní protilátky nebo nevhodný výběr metody pro tuto konkrétní primární protilátku (Baker, 2015). V prvním kroku bylo metodou Western blot ověřeno, že se dané proteiny v buněčné linii HT-29 nachází, a to jak u buněk nediferencovaných, tak diferencovaných. Pro obě použité primární protilátky byl detekován proužek v oblasti předpokládané molekulové hmotnosti. V dalším kroku bylo pomocí imunocytochemického barvení ověřeno, že protilátkami detekované proteiny mají předpokládanou subcelulární lokalizaci. Kromě proužku ve správné oblasti a předpokládané subcelulární lokalizace byla pozorována také zvýšená exprese PTEN a snížená exprese pAkt v diferencovaných buňkách, což odpovídá poznatkům v literatuře (Wang *et al.*, 2001; Laprise *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2003; Byun *et al.*, 2011). V dalším kroku bylo prokázáno, že tyto primární protilátky mohou být použity i pro metodu In-Cell ELISA, kdy byla naměřena dostatečná hodnota absorbance, jako signálu od protilátky. Pro všechny uvedené metody bylo také stanoveno optimální ředění primárních protilátek.

Pro studium diferenciace je využíván butyrát sodný (NaBt). Jako látka, kterou přirozeně tvoří bakterie v tlustém střevě, slouží jako zdroj energie pro kolonocyty, a přispívá k proliferaci a růstu kolonocytů. U buněčných kultur odvozených od nádorových buněk tomu však bývá naopak. U koncentrací 1–10mM NaBt byla pozorována inhibice růstu buněk a indukce diferenciace při *in vitro* experimentech (Csordas, 1996; Martínez-Maqueda *et al.*, 2015). Po použití 5mM NaBt byl v této

diplomové práci prokázán signifikantní rozdíl v relativní expresi pAkt a PTEN u nediferencovaných a diferencovaných buněk HT-29. U diferencovaných buněk byla zvýšena exprese PTEN a snížena exprese pAkt, což je v souladu s výsledky Wang *et al.* (2001) i Wang *et al.* (2007), kteří popsali, že inhibice PI3K dráhy je jeden z kroků nezbytných pro diferenciaci buněk.

V této práci bylo prokázáno, že PI3K dráha je propojena s metabolismem kyseliny arachidonové, na úrovni aktivity sEH. Detekovaný PTEN působí jako antagonist PI3K a zabraňuje fosforylaci Akt. Byla prokázána vyšší exprese PTEN u diferencovaných buněk HT-29, stejně jako u Wang *et al.* (2001) a Byun *et al.* (2011), kde byla také pozorována vyšší exprese proteinu PTEN u diferencovaných buněk. Po aplikaci inhibitoru sEH u nich došlo v případě obou koncentrací k signifikantnímu snížení exprese PTEN, což odpovídá předpokládanému spolupůsobení PTEN a sEH. Inhibice sEH u diferencovaných buněk HT-29 vede také k poklesu exprese villinu (Čížková *et al.*, 2021). Je známo, že villin pro to, aby vytvářel svazky, a tím se podílel na vytváření kostry mikrokvlků, interaguje s PIP2 (Khurana *et al.*, 2008). V nediferencovaných buňkách, kdy je zapnutá signální dráha PI3K, je PIP2 touto kinázou převáděn na PIP3. V diferencovaných buňkách dochází k nárůstu exprese PTEN, který PIP3 převádí zpět na PIP2. Inhibice sEH v diferencovaných buňkách snižuje expresi PTEN. Lze tedy předpokládat, že v buňkách je menší koncentrace PIP2 a villin se tak nepodílí na výstavbě mikrokvlků v dostatečné míře.

Dalším detekovaným proteinem z PI3K dráhy byl fosforylovaný Akt. Akt má svou roli během proliferace buněk a u nádorových onemocnění ovlivňuje angiogenezi i migraci (Wan *et al.*, 2020). Bývá detekován více u nediferencovaných buněk a po ose krypta-klk se snižuje jeho exprese, což bylo potvrzeno po diferenciaci buněk HT-29. V experimentální části této práce bylo měřeno mírné snížení exprese u nediferencovaných i diferencovaných buněk po použití inhibitoru sEH. U diferencovaných buněk však došlo k signifikantnímu zvýšení exprese při použití vyšší koncentrace inhibitoru sEH (10 μ M TPPU). Toto zvýšení exprese bylo prokázáno také Yao *et al.* (2016), kdy TPPU zvýšilo fosforylaci Akt u ledvinových embryonálních buněk člověka právě na pozici Ser473 stejně jako v případě použitých buněk HT-29. Zhang *et al.* (2006) potvrdili, že 14,15-EET, která představuje substrát sEH, stimuluje fosforylaci Akt. Stejně tak protektivní účinky EETs souvisely s aktivací PI3K/Akt dráhy (Yang *et al.*, 2007). Tyto poznatky potvrzují také využití inhibice sEH, která souvisí s protektivními účinky jí metabolizovanými EETs, chrání srdeční sval, endotel, kosti

nebo i buňky mozku (Liang *et al.*, 2019; Trindade-da-Silva *et al.*, 2020).

Bylo by vhodné prozkoumat propojení těchto procesů s dalšími signálními dráhami, protože kromě PI3K dráhy jsou pro diferenciaci střevních buněk důležité také MAP kinázové dráhy (Aliaga *et al.*, 1999; Laprise *et al.*, 2002), nebo použití dalších inhibitorů sEH. Dále by bylo vhodné prozkoumat, zda sEH hraje roli i v diferenciaci jiných typů buněk, stejně jako potenciální využití pro diagnostiku a léčbu relevantních onemocnění.

6 ZÁVĚR

Signální dráhy jsou důležitými komunikačními prostředky ve všech částech těla, různých tkáních, buňkách, a také jsou přítomny při jejich vývoji i metabolismu. Proto je jejich funkce známá i při diferenciaci buněk, kdy se rozhoduje o funkčním rozrůznění buněk v konkrétních oblastech. V této diplomové práci byl studován vliv PI3K dráhy na diferenciaci střevních buněk, a to skrze působení enzymu solubilní epoxid hydrolázy. Po použití inhibitoru solubilní epoxid hydrolázy byla sledována změna exprese proteinů fosforylovaného Akt a PTEN zapojených v PI3K dráze, které působí proti sobě. Pro jejich spolehlivou detekci byla provedena optimalizace primárních protilátek proti těmto proteinům několika metodami a stanoveno vhodné ředění. Dále bylo vybrané ředění protilátek použito pro detekci ovlivněných střevních buněk z nádorové buněčné linie HT-29 a bylo sledováno signifikantní ovlivnění relativní exprese proteinů u diferencovaných buněk po ovlivnění inhibitoru solubilní epoxid hydrolázy. Je zde tedy možné propojení metabolické dráhy solubilní epoxid hydrolázy s PI3K dráhou a jejich společnou úlohou při diferenciaci buněk ve střevech. Zjištěné výsledky jsou hodnotné pro další poznávání procesů v buňkách na molekulární úrovni, které stále ještě nebyly a nejsou plně objasněny. Stejně jako využití těchto poznatků v klinické praxi zvláště pro chronická a nádorová onemocnění.

SEZNAM LITERATURY

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) Molecular Biology of The Cell, pp. 932–937, *Garland Science*, New York, USA.
- Aliaga J. C., Deschenes C., Beaulieu J. F., Calvo E. L., Rivard N. (1999) Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *The American Journal of physiology* **277**(3), G631–641.
- Bahrami A., Khazaei M., Hasanzadeh M., ShahidSales S., Mashhad M. J., Farazestanian M., Sadeghnia H. R., Rezayi M., Maftouh M., Hassanian S. M., Avan A. (2018) Therapeutic potential of targeting PI3K/AKT pathway in treatment of colorectal cancer: rational and progress. *Journal of Cellular Biochemistry* **119**, 2460–2469.
- Bai Z., Zhang Z., Ye Y., Wang S. (2010) Sodium butyrate induces differentiation of gastric cancer cells to intestinal cells via the PTEN/phosphoinositide 3-kinase pathway. *Cell Biology International* **34**, 1141–1145.
- Baker M. (2015) Reproducibility crisis: blame it on the antibodies. *Nature* **521**, 274–276.
- Baker M. (2020) When antibodies mislead: the quest for validation. *Nature* **585**, 313–314.
- Barker N. (2014) Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**(1), 19–33.
- Beetham J. K., Tian T., Hammock B. D. (1993) cDNA cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from human liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **305**(1), 197–201.
- Bellien J., Joannides R. (2013) Epoxyeicosatrienoic acid pathway in human health and diseases. *Journal of cardiovascular pharmacology* **61**(3), 188–196.
- Brabletz S., Schmalhofer O., Brabletz T. (2009) Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *Journal of Pathology* **217**, 307–317.

- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brazil D. P., Hemmings B. A. (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in biochemical sciences* **26(11)**, 657–664.
- Buczacki S. (2019) Fate plasticity in the intestine: The devil is in the detail. *World Journal of Gastroenterology* **25(25)**, 3116–3122.
- Burnette W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* **112(2)**, 195–203.
- Byun D.-S., Ahmed N., Nasser S., Shin J., Al-Obaidi S., Goel S., Corner G. A., Wilson A. J., Flanagan D. J., Williams D. S., Augenlicht L. H., Vincan E., Mariadason J. M. (2011) Intestinal epithelial-specific PTEN inactivation results in tumor formation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **301(5)**, G856–864.
- Castel P., Toska E., Zumsteg Z. S., Carmona F. J., Elkabets M., Bosch A., Scaltriti M. (2014) Rationale-based therapeutic combinations with PI3K inhibitors in cancer treatment. *Molecular & Cellular Oncology* **1(3)**, e963447.
- Cohen E., Ophir I., Shaul Y. B. (1999) Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *Journal of cell science* **112(16)**, 2657–2666.
- Coons A. (1942) The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *The Journal of Immunology* **45(3)**, 159–170.
- Csordas A. (1996) Butyrate, aspirin and colorectal cancer. *European Journal of Cancer Prevention* **5**, 221–231.
- Čihák R. (2002) Anatomie 2, pp. 96–118, *Grada*, Praha, ČR.
- Čížková K., Steigerová J., Gurský J., Ehrmann J. (2016) Stimulating effect of normal-dosing of fibrates on cell proliferation: word of warning. *Lipids in Health and Disease* **15(164)**, 1–11.

- Čížková K., Tauber Z., Koubová K., Firic J., Ehrmann J. (2019) Soluble epoxide hydrolase as an important player in differentiation of intestinal cell: a lesson from cell culture and colorectal carcinoma tissue samples. *Virchows Archiv* **475**, S97.
- Čížková K., Birke P., Malohlava J., Tauber Z., Hušková Z., Ehrmann J. (2020) HT-29 and Caco2 cell lines are suitable models for studying the role of arachidonic acid-metabolizing enzymes in intestinal cell differentiation. *Cells Tissue Organs* **208**, 37–47.
- Čížková K., Koubová K., Foltýnková T., Jiravová J., Tauber Z. (2021) Soluble epoxide hydrolase as an important player in intestinal cell differentiation. *Cells Tissues Organs*, doi: 10.1159/000512807.
- Domingues M. F., Callai-Silva N., Piovesan A. R., Carlini C. R. (2020) Soluble epoxide hydrolase and brain cholesterol metabolism. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **12(325)**, 1–9.
- Dutton J., Hinman S., Kim R., Wang Y., Allbritton N. (2019) Primary cell-derived intestinal models: recapitulating physiology. *Trends in Biotechnology* **37(7)**, 744–760.
- Elghazi L., Balcazar N., Bernal-Mizrachi E. (2006) Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic β -cell mass and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 689–695.
- Ersahin T., Tuncbag N., Cetin-Atalay R. (2015) The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular Biosystems* **11**, 1946–1954.
- Faes S., Dormond O. (2015) PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 21138–21152.
- Franke T. F. (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* **27**, 6473–6488.
- Frisch S., Francis H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of Cell Biology* **124(4)**, 619–626.
- Hammock B. D., Gill S. S., Stamoudis V., Gilbert L. I. (1976) Soluble mammalian epoxide hydratase: action on juvenile hormone and other terpenoid epoxides. *Comparative Biochemistry and Physiology* **B 53(2)**, 263–265.

- Hao J., Chen Y., Yao E., Liu X. (2018) Soluble epoxide hydrolase inhibition alleviated cognitive impairments via NRG1/ErbB4 signaling after chronic cerebral hypoperfusion induced by bilateral carotid artery stenosis in mice. *Brain Research* **1699**, 89–99.
- He J., Wang C., Zhu Y., Al D. (2015) Soluble epoxide hydrolase: a potential target for metabolic diseases. *Journal of Diabetes* **8**, 305–313.
- Hu J., Frömel T., Fleming I. (2018) Angiogenesis and vascular stability in eicosanoids and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **37**, 425–438.
- Khurana S., George S. P. (2008) Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin's perspective. *FEBS Letters* **582**, 2128–2139.
- Koubová K. (2019) Role solubilní epoxidhydrolázy v diferenciaci střevních buněk *in vitro*. Bakalářská práce. Olomouc. Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie a genetiky. Vedoucí práce Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D.
- Laprise P., Chailier P., Houde M., Beaulieu J.-F., Boucher M.-J., Rivard N. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *The Journal of Biological Chemistry* **227(10)**, 8226–8234.
- Lee M., Miljanic M., Triplett T., Ramirez C., Aung K., Eckhardt S., Capasso A. (2020) Current methods in translational cancer research. *Cancer and Metastasis Reviews* **40(1)**, 7–30.
- Liang Z., Zhang B., Xu M., Morisseau C., Hwang S. H., Hammock B. D., Li Q. X. (2019) TPPU, a selective and potent dual inhibitor of soluble epoxide hydrolase and p38 kinase intervenes in Alzheimer's signaling in human nerve cells. *ACS Chemical Neuroscience* **10(9)**, 4018–4030.
- Lüllmann-Rauch R. (2012) Histologie, pp. 323–339, překlad vydalo nakladatelství Grada, Praha, ČR.
- Malínský J., Lichnovský V., Malínská Z. (2018) Přehled histologie člověka v obrazech II. díl, pp. 44, 50–52, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc, ČR.

- Martelli A., Tabellini G., Bressanin D., Ognibene A., Goto K., Cocco L., Evangelisti C. (2012) The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochimica et Biophysica Acta* **1823**, 2168–2178.
- Martínez-Maqueda D., Miralles B., Recio I. (2015) HT29 cell line. The impact of food bio-actives on gut health, pp. 113–121, *Springer*, New York, USA.
- Mescher A. L. (2016) Junqueira's Basic Histology, pp. 314–318, *McGraw-Hill Education*, New York, USA.
- Mescher A. L. (2018) Junqueirovy základy histologie, pp. 10, 88, 299–301, 319, 322–324, překlad vydalo nakladatelství *Galén*, Praha, ČR.
- Milella M., Falcone I., Conciatori F., Incani U. C., Curatolo A. D., Inzerilli N., Nuzzo C. M. A., Vaccaro V., Vari S., Cognetti F., Ciuffreda L. (2015) PTEN: multiple functions in human malignant tumors. *Frontiers in Oncology* **5(24)**, 1–14.
- Morisseau C., Hammock B. D. (2013) Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annual review of pharmacology and toxicology* **53**, 37–58.
- NCBI databáze: AKT1, AKT2, AKT3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; navštíveno 25. 11. 2020.
- Newman J. W., Morisseau C., Hammock B. D. (2005) Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Progress in Lipid Research* **44**, 1–51.
- Norwood S., Liao J., Hammock B. D., Yang G.-Y. (2010) Epoxyeicosatrienoic acids and soluble epoxide hydrolase: potential therapeutic targets for inflammation and its induced carcinogenesis. *American journal of translational research* **2(4)**, 447–457.
- O'Hurley G., Sjöstedt E., Rahman A., Li B., Kampf C., Ponten F., Gallagher W. M., Lindskog C. (2014) Garbage in, garbage out: a critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Molecular Oncology* **8**, 783–798.
- Ochsner S., Abraham D., Martin K., Ding W., McOwiti A., Kankanamge W., Wang Z., Andreano K., Hamilton R., Chen Y., Hamilton A., Gantner M., Dehart M., Qu S., Hilsenbeck S., Becnel L., Bridges D., Ma'ayan A., Huss J., Stossi F., Foulds C.,

- Kralli A., McDonell P., McKenna N. (2019) The signaling pathway project, an integrated `omics knowledgebase for mammalian cellular signaling pathways. *Nature. Scientific Data* **6**:252.
- Parsons R. (2020) Discovery of the PTEN tumor suppressor and its connection to the PI3K and AKT oncogenes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, doi: 10.1101/cshperspect.a036129.
- Pereira J., Awatade N., Loureiro C., Matos P., Amaral M., Jordan P. (2016) The third dimension: new developments in cell culture models for colorectal research. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 3971–3989.
- Porta C., Paglino C., Mosca A. (2014) Targeting PI3K/Akt/mTOR signalling in cancer. *Frontiers in Oncology* **4(64)**, 1–11.
- Ruth Michaelis U., Fisslthaler B., Medhora M., Harder D., Fleming I., Busse R. (2003) Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor. *The FASEB Journal* **17(6)**, 770–788.
- Ryšávka P., Kohutková Lánová M. (2018) Butyrát. *Praktické lékařství* **14(2)**, 73–76.
- Sheng H., Shao J., Townsend jr C. M., Evers B. M. (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells. *Gut* **52**, 1472–1478.
- Simon-Assmann P., Turck N., Sidhoum-Jenny M., Gradwohl G., Kedinger M. (2007) *In vitro* models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell biology and toxicology* **23(4)**, 241–256.
- Spit M., Koo B.-K., Maurice M. M. (2018) Tales from the crypt: intestinal niche signals in tissue renewal, plasticity and cancer. *Open Biology* **8**, 180120.
- Stumpf M., Blokzijl-Franke S., Hertog J. (2016) Fine-tuning of Pten localization and phosphatase activity is essential for zebrafish angiogenesis. *PLoS One* **11(5)**, e0154771.

- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**(9), 4350–4354.
- Trindade-da-Silva C. A., Clemente-Napimoga J. T., Abdalla H. B., Rosa S. M., Ueira-Vieira C., Morisseau C., Verri Jr W. A., Montalli V. A. M., Hammock B. D., Napimoga M. H. (2020) Soluble epoxide hydrolase inhibitor, TPPU, increases regulatory T cells pathway in an arthritis model. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **34**(7), 9074–9086.
- Van Weemen B. K., Schuurs A. H. W. M. (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters* **15**(3), 232–236.
- Voet D., Voet J. G. (2011) Biochemistry, pp. 732–733, *John Wiley & Sons*, Hoboken, New Jersey, USA.
- Wan M., Wang Y., Zeng Z., Deng B., Zhu B., Cao T., Li Y., Xiao J., Han Q., Wu Q. (2020) Colorectal cancer (CRC) as a multifactorial disease and its causal correlations with multiple signaling pathways. *Bioscience Reports* **40**, BSR20200265.
- Wang Q., Wang X., Hernandez A., Kim S., Evers B. M. (2001) Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **120**, 1381–1392.
- Wang Q., Zhou Y., Wang X., Chung D. H., Evers B. M. (2007) Regulation of PTEN expression in intestinal epithelial cells by JNK activation and NF- κ B inhibition. *Cancer Research* **67**(16), 7773–7781.
- Worby C. A., Dixon J. E. (2014) PTEN. *The Annual Review of Biochemistry* **83**, 641–669.
- Yang S., Lin L., Chen J., Lee C., Seubert J., Wang Y., Wang H., Chao Z., Tao D., Gong J., Lu Z., Wang D., Zeldin D. (2007) Cytochrome P450 epoxigenases protect endothelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor- α via MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *America journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **293**(1), H142 – 151.

- Yao E., Tang Y., Liu X., Wang M. (2016) TPPU protects Tau from H₂O₂-induced hyperphosphorylation in HEK293/tau cells by regulation PI3K/AKT/GSK-3 β pathway. *Journal of Huazhong University of Science and Technology* **36(6)**, 785–790.
- Young B., Lowe J. S., Stevens A., Heath J. W. (2006) Wheater's Functional Histology, p. 283, *Elsevier*, Amsterdam, Nizozemsko.
- Záznam z Encyclopaedia Britannica (původně 1999, naposledy revidováno 2020): Large intestine. <https://www.britannica.com/science/large-intestine>; navštíveno 10. 9. 2020.
- Záznam z Cusabio Technology: PI3K-Akt signaling pathway. <https://www.cusabio.com/pathway/PI3K-Akt-signaling-pathway.html>; navštíveno 9. 10. 2020.
- Záznam z UCSC Genome Browser (vloženo 2013): Soluble epoxide hydrolase. <https://genome-euro.ucsc.edu/>; navštíveno 1. 12. 2020.
- Záznam z University of Waikato: Villi in the small intestine. <https://www.sciencelearn.org.nz/images/2259-villi-in-the-small-intestine>; navštíveno 26. 11. 2020.
- Zhang B., Cao H., Rao G. N. (2006) Fibroblast growth factor-2 is a downstream mediator of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling in 14,15-epoxyeicosatrienoic acid-induced angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **281(2)**, 905–914.
- Zhang G., Kodani S., Hammock B. D. (2014) Stabilized epoxygenated fatty acids regulate inflammation, pain, angiogenesis and cancer. *Progress in Lipid Research* **53**, 108–123.