

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Kristýna Suchánková

**Význam V-ATPasy pro rezistenci nádorových buněk**

Importance of V-ATPase for cancer cell resistance

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha 2021



### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitele Prof. MUDr. Tomáše Eckschlagera, CSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne .....

Podpis: .....

## **Poděkování:**

Chtěla bych zde poděkovat svému školiteli Prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, Csc. za ochotu, vstřícnost a pohotovost při vypracovávání této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat MVDr. Janu Hrabětovi, Ph.D. a Mgr. Marií Belhajové za pomoc při plánování experimentální části práce, objasnění instrumentace a za konzultaci získávaných výsledků a zbylému kolektivu postgraduálních studentů a pracovníkům Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Motole za ochotu kdykoliv poradit a pomoci. V neposlední řadě bych zde chtěla poděkovat také mému manželovi a celé rodině za trpělivost a velkou podporu nejen při zpracovávání této práce, ale i během celé doby mého studia.

## Abstrakt

Chemorezistence je jednou z hlavních příčin selhání léčby chemoterapie nádorů. Vakuolární ATPasa (V-ATPasa) je ATP-dependentní protonová pumpa podílející se na regulaci pH buněk, buněčných organel i intracelulárního prostoru. V souvislosti s metabolismem nádorových buněk (metabolismus glukosy, hypoxie, nedostatečné prokrvení nádorové tkáně) dochází k výrazné acidifikaci extracelulárního prostoru a intracelulárních kompartmentů. Bazická cytostatika přestupují na základě pH gradientu do kyselých organel, kde jsou následně protonována a akumulována. Tento mechanismus se nazývá lysosomální sekvestrace a je jedním z mechanismů rezistence nádorových buněk k podávaným léčivům, která se v důsledku vychytávání nedostanou do míst svého účinku. Zvýšená exprese V-ATPas byla popsána v souvislosti s chemorezistencí a progresí nádorů.

Tato práce je zaměřena na sledování membránové podjednotky  $V_{0d}$  z komplexu V-ATPasy a změn rezistence vůči ellipticinu způsobené umlčením genu této podjednotky v lidských neuroblastomových liniích UKF-NB-4 (senzitivní) a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> (rezistentní k ellipticinu). Exprese  $V_{0d}$  byla nejprve zkoumána na úrovni mRNA pomocí kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR). K umlčení vybraných genů podjednotek V-ATPasy byla využita transfekce buněk molekulami siRNA (z angl. small interfering RNA), jejíž úspěšnost byla ověřena na proteinové úrovni metodou Western blot i na úrovni mRNA pomocí RT-PCR. Konfokální mikroskopií byla sledována subcelulární lokalizace ellipticinu v buněčných liniích ovlivněných transfekcí. Proliferace transfekovaných buněk a jejich viabilita byly sledovány v reálném čase pomocí systému xCELLigence a pomocí činidla PrestoBlue. Bylo prokázáno, že exprese podjednotky  $V_{0d}$  V-ATPasy je zvýšená v neuroblastomové linii rezistentní vůči ellipticinu. Po transfekci buněk UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> molekulami siATP6V0D1 a následné inkubaci s ellipticinem došlo k výraznému snížení jejich proliferačních schopností a viability – podjednotka  $V_{0d}$  může tedy zásadně ovlivňovat rezistenci neuroblastomových linií vůči ellipticinu. Již samotná transfekce buněk molekulami siRNA měla negativní vliv na jejich viabilitu. Kombinace transfekce buněk molekulami siRNA a jejich inkubace s ellipticinem způsobuje vznik vakuol, jejichž původ nebyl identifikován.

**Klíčová slova:** neuroblastom, ellipticin, chemorezistence nádorových buněk, V-ATPasa, lysosomální sekvestrace cytostatik

## Abstract

Chemoresistance is one of the main causes of failure of anticancer chemotherapy. Vacuolar-type ATPase (V-ATPase) is an ATP-dependent proton pump involved in the regulation of the pH in cells, cell organelles and the intracellular space. A significant acidification of the extracellular space and intracellular compartments occurs in connection with the metabolism of tumour cells (glucose metabolism, hypoxia, insufficient blood perfusion of the cancer tissue). Basic drugs are transferred into acidic organelles based on the pH gradient, where they are then protonated and accumulated. This mechanism is called lysosomal sequestration and is one of the mechanisms how tumour cells resist to applied drugs, which then do not reach their target site in cancer cell. An increased expression of V-ATPases has been described in relation to chemoresistance and the progression of tumours.

This dissertation is focused on observing the membrane subunit  $V_0d$  from the complex of V-ATPase and the changes in resistance to ellipticine caused by the silencing of this subunit's gene in human neuroblastoma cell lines UKF-NB-4 (sensitive) and UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> (resistant to ellipticine). The expression of the  $V_0d$  protein was first examined on mRNA level using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The silencing of selected V-ATPase subunits genes was mediated by cell transfection with specific siRNA molecules (small interfering RNA) and its success was measured both on the protein level by using the Western blot method and on the mRNA level by RT-PCR. Confocal microscopy was used to observe the subcellular localisation of ellipticine in the transfected cell lines. The proliferation of transfected cells and their viability were evaluated in real-time using the xCELLigence system and PrestoBlue agent. It was proven that the expression of the  $V_0d$  subunit of V-ATPase is increased in the ellipticine-resistant neuroblastoma cell line. UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> cells transfected by siATP6V0D1 incubated with ellipticine showed significantly reduced proliferation and viability – the  $V_0d$  subunit can therefore significantly influence resistance to ellipticine in neuroblastoma cells.  $V_0d$  knock down alone had a negative effect on their viability. The combination of cells siRNA-mediated transfection and their incubation with ellipticine leads to the formation of vacuoles, the origin of which was not identified. [IN CZECH]

**Keywords:** neuroblastoma, ellipticine, cancer cells chemoresistance, V-ATPase, lysosomal sequestration of cytostatic drugs [IN CZECH]

## Obsah

Seznam použitých zkratek:.....	7
1 Úvod.....	9
1.1 Nádorová onemocnění .....	9
1.1.1 Nádorová onemocnění dětí .....	12
1.2 Nádorové buňky.....	13
1.2.1 Neuroblastom.....	17
1.3 Protinádorová terapie.....	21
1.3.1 Ellipticin.....	24
1.4 Rezistence .....	25
1.5 Vakuolární H <sup>+</sup> -ATPasa.....	29
1.5.1 Struktura vakuolární H <sup>+</sup> -ATPasy.....	29
1.5.2 Funkce vakuolární H <sup>+</sup> -ATPasy.....	31
1.5.3 Regulace vakuolární H <sup>+</sup> -ATPasy .....	34
2 Cíl práce .....	38
3 Materiál a metody .....	39
3.1 Použité chemikálie .....	39
3.2 Použité přístroje .....	41
3.3 Metody.....	42
3.3.1 Rozmrazení buněk.....	42
3.3.2 Kultivace neuroblastomových buněčných linií .....	42
3.3.3 Příprava vzorků buněčných extraktů pro analýzu pomocí kvantitativní reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) a metody Western blot .....	43
3.3.4 Transfekce buněk molekulami siRNA.....	43
3.3.5 Izolace RNA ze vzorků neuroblastomových buněčných linií pro reverzní transkripci a kvantitativní polymerázovou reakci v reálném čase (RT-PCR) .....	44
3.3.6 Reverzní transkripce.....	44

3.3.7 Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (Real-time PCR, RT-PCR) genu V-ATPasy <i>ATP6V0D1</i> .....	45
3.3.8 Izolace proteinů ze vzorků neuroblastomových buněčných linií pro analýzu metodou Western blot.....	46
3.3.9 Stanovení koncentrace izolovaných proteinů dle Lowryho.....	46
3.3.10 Separace izolovaných proteinů elektroforézou na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	47
3.3.11 Analýza proteinů ze vzorků neuroblastomových buněčných linií metodou Western blot .....	47
3.3.12 Lokalizace ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích a pozorování změn po jejich transfekci siRNA konfokálním mikroskopem .....	48
3.3.13 Stanovení proliferace buněk v reálném čase technologií xCELLigence RTCA DP .....	49
3.3.14 Stanovení viability buněk neuroblastomových linií pomocí činidla PrestoBlue .....	49
3.3.15 Statistické zpracování dat .....	50
4 Výsledky.....	51
4.1 Stanovení exprese genu <i>ATP6V0D1</i> vakuolární H <sup>+</sup> -ATPasy v lidské neuroblastomové buněčné linii senzitivní (UKF-NB-4) a rezistentní k ellipticinu (UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> ) po jejich ovlivnění ellipticinem metodou RT-PCR.....	51
4.2 Ověření úspěšnosti transfekce buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> siRNA (siATP6V0D1).....	52
4.3 Sledování vlivu transfekce buněk vybranými siRNA na jejich viabilitu a subcelulární lokalizaci ellipticinu .....	55
4.4 Stanovení proliferace neuroblastomových buněk po jejich transfekci siRNA a inkubaci s ellipticinem.....	58
4.5 Stanovení viability neuroblastomových buněk po jejich transfekci siRNA a po inkubaci s ellipticinem.....	60
5 Diskuze .....	62
6 Závěr .....	66
Seznam literatury.....	67

## Seznam použitých zkratk:

ABC	proteinový transportér (z angl. ATP Binding Cassette)
ADP	adenosindifosfát
Akt	serin/threonin protein kinasa B
ALK	kinasa anaplastického lymfomu (z angl. Anaplastic lymphoma kinase)
ATP	adenosintrifosfát
BMP	kostní morfogenetický protein (z angl. Bone morphogenetic protein)
B-Raf	protoonkogen, serin/threonin-specifická kinasa
CTL4 A	cytotoxický protein asociovaný s T-lymfocyty (z angl. Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4 A)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. epidermal growth factor receptor)
EMT	epiteliálně-mesenchymální tranzice
ER	endoplasmatické retikulum
ERK	extracelulární signálem regulovaná kinasa (z angl. extracellular signal regulated kinase)
FGF	fibroblastový růstový faktor (z angl. fibroblast growth factor)
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. Human Immunodeficiency Virus)
JAK	Janus kinasa
K-Ras	protoonkogen
MDR	mnohočetná léková rezistence (z angl. multidrug resistance)
MKI	procento buněk s mitotickou aktivitou nebo prodávající karyorhýzu (z angl. mitosis-karyorrhexis index)
mRNA	messangerová ribonukleová kyselina
mTOR	serin/threonin protein kinasa (z angl. mechanistic/mammalian target of rapamycin)

mTORC1	proteinový komplex (z angl. mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1)
<i>MYCN</i>	protoonkogen
NB	neuroblastom
NCD	nepřenosná onemocnění (z angl. noncommunicable disease)
NF- $\kappa$ B	transkripční faktory (z angl. nuclear factor kappa B)
N-Ras	protoonkogen
p53	tumor-supresorový protein
PD	receptor buněk (z angl. programmed cell death)
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace $H^+$ iontů
PI3K	fosfatidylinositol-3 kinasa
PRR	(pro)reninový receptor
Ras	protein vázající GTP
RAVE	regulátor $H^+$ -ATPasa na vakuolárních a endosomálních membránách
<i>Rb</i>	tumor-supresorový gen (z angl. Retinoblastoma)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT-PCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (z angl. Real-time polymerase chain reaction)
siRNA	malá interferující ribonukleová kyselina (z angl. small interfering RNA)
STAT3	transkripční faktor (z angl. Signal transducer and activator of transcription 3)
TFEB	transkripční faktor EB
<i>Tp53</i>	tumor-supresorový gen (z angl. Tumor protein p53)
V-ATPasa	vakuolární $H^+$ -ATPasa
VEGFR	receptor růstového faktoru (z angl. vascular endothelial grow factor receptor)
Wnt	signalizační glykoproteiny (z angl. wingless-related integration site)

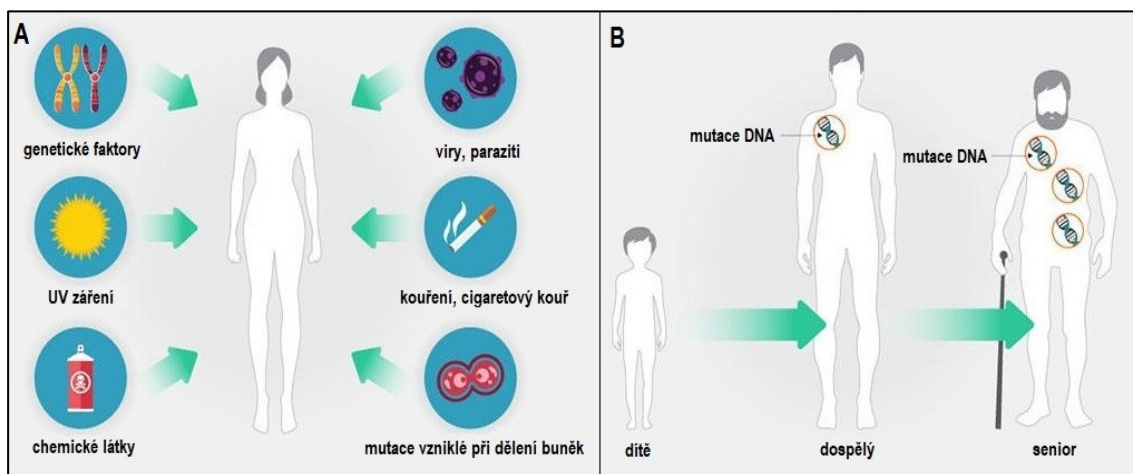
# 1 Úvod

Maligní nádory zahrnují širokou skupinu onemocnění, které postihují libovolnou část organismu. Jednou z definic pro nádor je rychlý nekontrolovaný růst abnormálních buněk, který není omezován hranicemi tkání a které mají navíc schopnost opustit místo vzniku a usadit se kdekoli v organismu, tedy metastazovat. Příčiny jejich vzniku nejsou přesně známy a liší se u různých nádorů. Určitý vliv mají kombinace faktorů genetických a environmentálních, dále věk, stravovací návyky a životní styl. Nádory se řadí mezi „nepřenosná onemocnění“ (angl. noncommunicable diseases, NCDs), na která ročně zemře až 41 milionů obyvatel (71 % celkové globální úmrtnosti). Mezi nejsmrtelnější NCD patří kardiovaskulární onemocnění (17,9 mil./rok), nádory (9 mil./rok), respirační onemocnění (3,9 mil./rok) a diabetes (1,6 mil./rok). Tyto nemoci jsou čím dál častější a vyskytují se u lidí všech věkových kategorií na celé zemi. Jejich rostoucí výskyt v populaci může být způsoben vyšším věkem, kterého se lidé dožívají, nevyváženou stravou, klesající fyzickou aktivitou, čtenější expozici tabákovému kouři a častějšímu požívání alkoholu. Významným činitelem je také stres, který je spolu s některými výše zmíněnými vlivy příčinou vzniku metabolických rizikových faktorů NCD – vysokého tlaku, nadváhy či obezity, hyperglykemie a hyperlipidemie. Pro zlepšení momentální situace a snížení úmrtí spojených s NCDs je v klinické medicíně důležitá především včasná detekce, skrining, správná terapie a pravidelné sledování průběhu nemoci. Bohužel nejsou ve všech případech ještě známy markery, které by pomohly nemoc včas zachytit a monitorovat, proto je důležitý vědecký výzkum zabývající se vývojem léčiv a studiem patologie nemocného organismu [1], [2].

## 1.1 Nádorová onemocnění

Nádor vzniká jako mnohostupňový proces, během kterého se normální buňka mění v nádorovou, obecně dochází k vývoji přes stádia prekanceróz až po vznik maligního tumoru. Je to výsledek interakce mnoha vlivů, především genetických faktorů a tří kategorií vnějších karcinogenů: fyzikálních (UV záření, radiace, mechanické dráždění, termické vlivy), chemických (tabákový kouř, alkohol, arsen, aflatoxin) a biologických (infekce určitými viry, bakteriemi a parazity, např. HIV, HBV, HCV, *Helicobacter pylori* a schistosoma (krevnička)) (*Obr. 1*, str. 10). Velmi významným faktorem pro vývoj nádorového onemocnění je stárnutí. Díky měnícím se životním podmínkám a velkým

pokrokům medicíny dochází k prodlužování života populace, s tímto však souvisí i zdravotní problémy spojené se stárnutím organismu vyvolané porušenou efektivní regenerací a sníženou schopností buněčné reparační, to znamená, že se v těle hromadí různá poškození a molekuly toxické pro buňky (peroxid vodíku, aktivní formy kyslíku), které usnadňují vývoj nádoru [1].



Obr. 1: Ukázka vybraných karcinogenů a rizikových faktorů pro vývoj nádorového onemocnění (A). Postupná akumulace genetických modifikací ve stárnoucím organismu zvyšuje pravděpodobnost vzniku nádoru (B). Převzato a upraveno z [3].

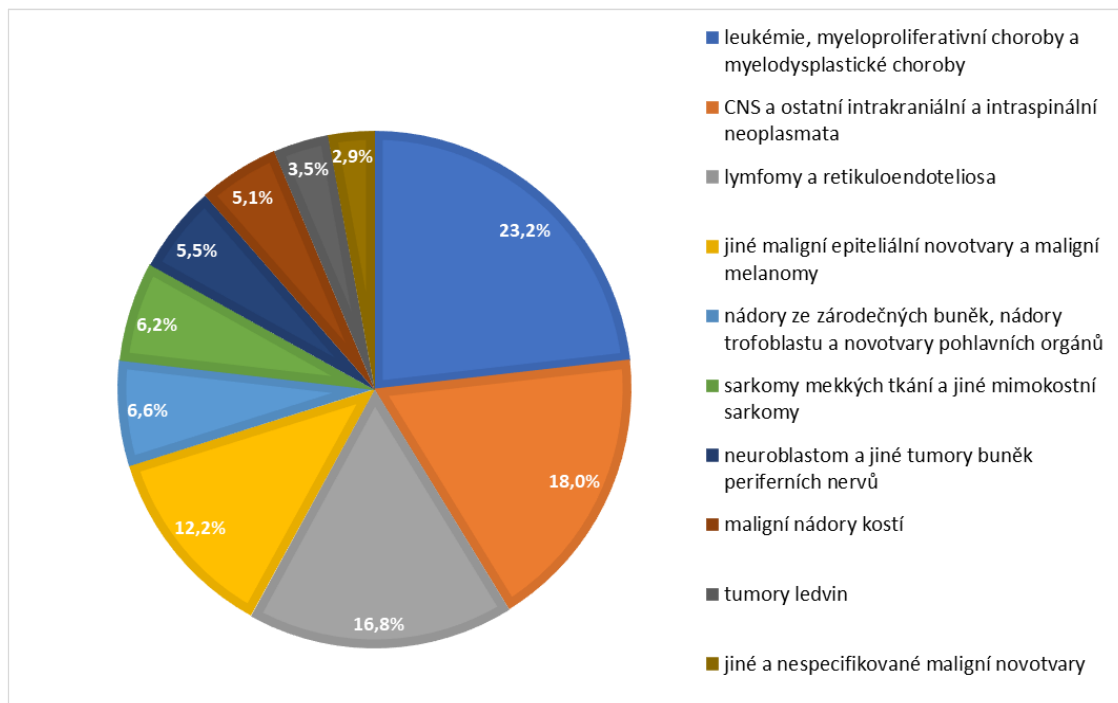
Mezi nejčastější nádory patří karcinomy plic, prsu, prostaty, kolorektální karcinom, nádory kůže a žaludku. Všechny zmíněné jsou také nejčastější příčinou smrti onkologických pacientů. Různé typy nádorů bývají nejčastěji rozlišovány dle orgánu či tkáně, ve které novotvar vzniká, mohou se od sebe ale lišit i původem tkáně, ze které vychází. V takovém případě můžeme mluvit o karcinomu, sarkomu, leukémii, lymfomu, gliálních nádorech či melanomu. Nejčastějším druhem jsou karcinomy, nádory vycházející z epiteliálních buněk (výskyt na vnějším i vnitřním povrchu těla). Existují také mnohé typy epiteliálních buněk, díky čemu se karcinomy dělí na specifitější poddruhy, např. adenokarcinomy z epitelu žlázoového nebo spinocelulární karcinomy z dlaždicového epitelu. Sarkomy jsou nádory z mesenchymu, které se tvoří v kostech a měkkých tkáních jako jsou svaly, tuková tkáň a cévy, specifickým příkladem mohou být osteosarkomy – nejčastější nádory kostí. Nádory z krve tvorných buněk vznikající v kostní dřeni se nazývají leukémie. Dochází zde k hromadění nádorových leukocytů, které vytěsňují ostatní krevní buňky a zhoršují tak okysličování tkání, snižují srážení krve vedoucí ke krvácení a také snižují imunitní odpovědi na infekce. Buňky zajišťující imunitní systém mohou tvořit dva typy nádorů – lymfomy zakládáné z T-buněk

a B-buněk nebo mnohočetné myelomy vycházející z plasmatických buněk. Dalším tumorem je melanom, který vzniká přeměnou melanocytů, buněk, které produkují barvivo melanin a vyskytují se hlavně v pigmentovaných tkáních (kůže, oči) [3].

Incidence, tedy počet nových onkologických pacientů vztažených na počet obyvatel za časové období (počet nově vzniklých nádorů na 100 000 obyvatel za rok), celosvětově narůstá, mortalita (úmrtnost) se lehce snižuje, roste ale prevalence, tedy počet žijících pacientů, kteří prodělali nádorové onemocnění. V České republice každý třetí obyvatel onemocní zhoubným nádorem a každý čtvrtý na toto onemocnění zemře. Úmrtnost na zhoubné nádory však vykazuje stagnaci nebo dokonce mírný pokles, což je výsledkem nejen zlepšování léčby, ale i důslednější prevence, kterou lze dělit do čtyř druhů (primární až kvartérní). Podstatou primární prevence je předejít vzniku nádoru pomocí zdravého životního stylu (vhodné stravovací návyky, omezení nadváhy, alkoholu a cigaret) a kontrola tzv. preventabilních nádorů, tedy onkologických onemocnění, které se vyskytují opakovaně v rodinných anamnézách, jako kolorektální karcinom, karcinomy prsu a děložního čípku či ORL nádory. Cílem primární prevence v onkologii je tedy snížení incidence maligního onemocnění. Sekundární prevence má za úkol skrining, tedy celoplošné testování populace určité věkové kategorie a pohlaví, vedoucí k včasnému podchycení zhoubných nádorů v takovém stádiu, ve kterém jsou nejlépe léčitelné. V České republice existují tři základní screeningové programy – mamologický (vyšetření prsou), cervikální (vyšetření děložního hrdla) a kolorektální (vyšetření tlustého střeva a konečníku). Cílem terciární prevence je zachytit možnou recidivu, tedy návrat nádorového onemocnění po primárním vyléčení, a to buď v bezpříznakovém stádiu nebo ve fázi, kdy je možné onemocnění úspěšně léčit. Onkologičtí pacienti jsou z tohoto důvodu doživotně sledováni, v některých případech však nastává problém v podobě vzniku druhotných nádorů mimo sledovaný orgán či hlídanou diagnózu. Kvartérní prevence se zabývá pacienty s nevléčitelnými nádory, předvídaním důsledků postupující nemoci a poskytováním prostředků a služeb, které pomohou daným pacientům a jejich rodinám udržet co nejlepší kvalitu zbývajících života (dostupnost analgetické léčby, psychologická a sociologická podpora) [4].

### 1.1.1 Nádorová onemocnění dětí

Zhoubné nádory u dětí patří mezi vzácná onemocnění, zahrnují asi 1 % celkového množství všech nádorů. V průměru onemocní 1 dítě z 600, incidence je všeobecně vyšší u chlapců, pro obě pohlaví je nejčastější výskyt nádoru v období věku do pěti let a poté v období puberty a během dospívání. Dětské typy nádorů jsou značně odlišné od malignit dospělých, a to díky odlišným vlastnostem pacienta (tedy nemocného dítěte) i nádorů samotných. V průběhu dětství dochází k vývoji organismu a jednotlivých orgánů, léčebné metody tedy musí být voleny tak, aby nedocházelo k pozdějším následkům spojených s narušením tohoto rozvoje. Na druhou stranu však v dětském věku nedochází ke kumulaci mutací, ani zde tak silně nepůsobí faktory životního stylu a vnějšího prostředí. Vznik většiny dětských nádorů je vysoce sporadický. Malá část pacientů (5 – 10 %) je zatížena genetickými predispozicemi, určitou roli mohou sehrát i poruchy imunity. Epigenetické změny spojené s tumorigenezí mohou být na děti přenesené předchozí generací, největší vliv má matka v prvním trimestru gravidity (dochází k buněčné diferenciaci při časně embryogenezi) a následně při kojení (budování imunity) – životním stylem i stravou ovlivňuje riziko nádoru u dítěte [5].



Obr. 2: Nečastější typy dětských nádorů v České republice v letech 1994–2016. Převzato a upraveno z [6].

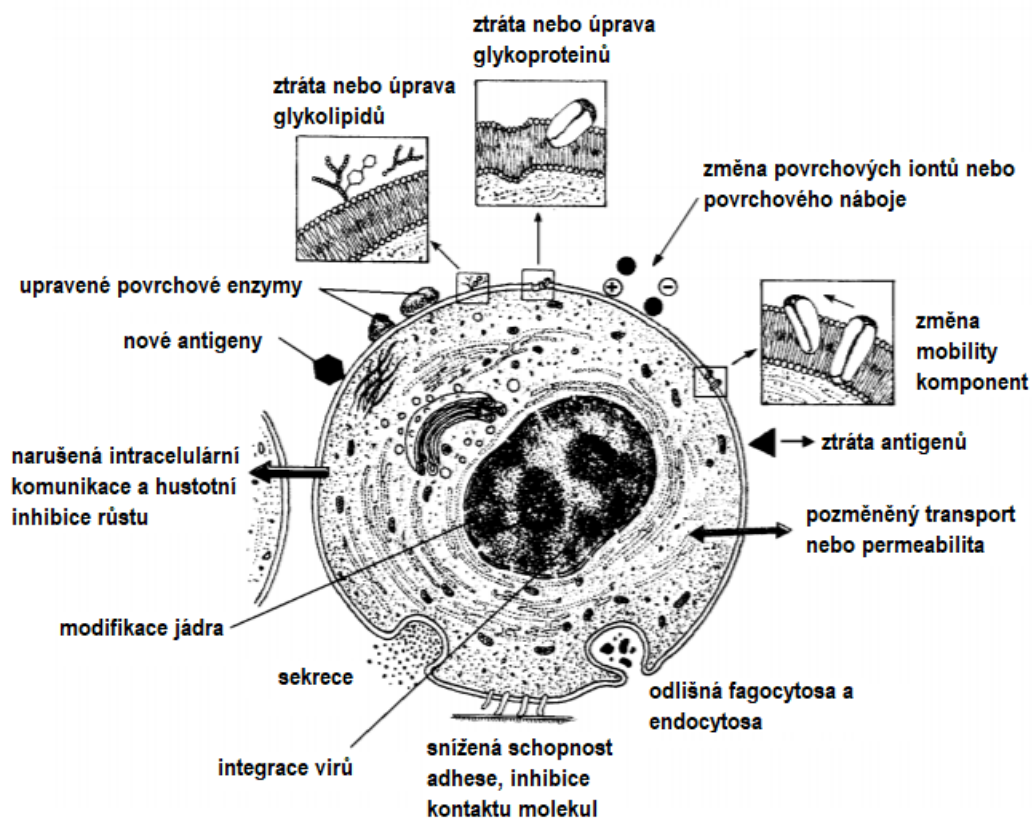
Z biologického hlediska jsou nádory v dětském věku vysoce agresivní – hojně proliferují a časně metastazují. Mezi typické dětské typy nádorů jsou řazeny nádory embryonálního typu, vyrůstající z nediferenciované tkáně (neuroblastom, retinoblastom, nefroblastom, hepatoblastom), a nádory mesenchymálního typu, vyrůstající z pojivové tkáně (sarkomy). V České republice je onkologicky nemocným dětem nejčastěji diagnostikována leukémie, lymfomy a nádory centrální nervové soustavy (*Obr. 2, str. 12*) [6]. Léčba je v dětské onkologii úspěšnější než u dospělých. Většina dětských nádorů je vysoce chemosenzitivních a radiosenzitivních, k tomu je známo, že organismus v mladém věku rychleji regeneruje a lépe se adaptuje. Dlouhodobě přežívá zhruba 85 % dětí s nádory [5], [6].

## 1.2 Nádorové buňky

Zdravé buňky v organismu přirozeně procházejí několika etapami, během kterých dochází k jejich dělení (buněčný cyklus), obnově, opravám méně závažných poškození a nahrazování starých buněk či buněk s mutacemi novými buňkami. Všechny zmíněné procesy jsou přísně kontrolovány a řízeny mnoha mechanismy, které dohlížejí na buněčný cyklus a regulují apoptosu. Hlavní charakteristikou nádorových buněk je selhání některého z kontrolních kroků vlivem mutací, které mohou vést ke ztrátě regulace mitosy a celkové akceleraci buněčného cyklu vedoucí až k nekontrolovatelnému růstu, dále ztráta specializace a diferenciaci buněk, odolnost vůči apoptose, s tím spojená schopnost buňky opustit místo vzniku nádoru za účelem nového maligního růstu v jiné tkáni (tzv. metastazování) a dále invazivní růst a schopnost zničit tkáň tělu vlastní [4], [7], [8].

Mnohé morfologické znaky maligních buněk (*Obr. 3, str. 14*) souvisí s rozdílností na úrovni metabolismu. Zásadní roli pro vznik nádoru mají změny v jádře zahrnující úpravu povrchu, objemu, tvaru, struktury i homogenity, konkrétně například vyšší počet pórů v jaderné membráně, tvorba inkluzí či redukce heterochromatinu. Dále mohou nádorové buňky obsahovat atypické formy chromosomů vznikající v důsledku zvýšeného počtu mitos, během kterých se objevují defektní struktury mitotického vřeténka tvořící tzv. „trojčípé nebo čtyřčípé hvězdy“. Pro cytoplasmu nádorových buněk je typický obsah nových struktur či absence struktur klasických, vyskytuje se zde větší koncentrace ribosomální a messengerové ribonukleové kyseliny (rRNA, mRNA), které způsobují bazické prostředí. Celkové množství cytoplasmy je menší, ale obsahuje velké množství vakuol. Hrubé endoplasmatické retikulum (ER) má jednodušší strukturu, v okolí jádra

se však vyskytuje větší množství ribosomů a polysomů, a to z důvodu zvýšené potřeby produkce proteinů pro růst a množení buněk. Golgiho aparát bývá v maligních buňkách málo vyvinutý, tento fakt koreluje s nižší buněčnou diferenciací. Počet mitochondrií se snižuje s rostoucí tumorigenezí, v membránách probíhá abnormální glykolysa známá jako „Warburgův efekt“, tedy omezení oxidativního metabolismu v mitochondriích a současné zvýšení glykolysy za produkce laktátu i v podmínkách normoxie. V neposlední řadě mají na maligní procesy velký vliv změny cytoskeletu, které ovlivňují schopnost buněčného pohybu, a také změny buněčné membrány, respektive jejího obsahu proteinů a karbohydrátů, které působí jako enzymy a povrchové receptory zajišťující ochranu proti imunitnímu systému hostitele, urychlující transport živin a zlepšující pohyb buněk i jejich proliferaci. Změna morfologie buňky může také sloužit jako kritérium pro charakterizaci nádoru, a to například sledováním bazální membrány (selektivní bariéra zajišťující připojení epitelu k vazivu a regulující látkovou výměnu mezi nimi), která je přítomna v buňkách benigního nádoru, ale u nádorů maligních je fragmentovaná, reduplikovaná či dochází k její destrukci pomocí lytických faktorů [7].



Obr. 3: Výběr charakteristických morfologických znaků maligní buňky. Převzato a upraveno z [9].

Proliferace je jedním z hlavních znaků tumorů. Příčinou může být buď zvýšená rychlost dělení nádorových buněk akcelerací buněčného cyklu nebo porucha v diferenciaci buněk. Zvýšené množství buněk v nádorové tkáni může být způsobeno také potlačením apoptosy, toto bylo pozorováno u některých lymfomů a chronické lymfoidní leukémie. Na molekulární úrovni je proliferace buněk (zároveň s buněčným cyklem) řízena třemi hlavními mechanismy – protoonkogeny (např. K-Ras, N-Ras, B-Raf), tumor-supresorovými geny (např. *Tp53*, *Rb*) a miss-match repair geny. Produkty protoonkogenů jsou transkripční a růstové faktory či jejich receptory. Důsledkem mutací v promotoru nebo zvýšenou transkripcí podmíněnou např. amplifikací může docházet k přeměně protoonkogenů na onkogeny, které podporují nekontrolovanou a nadměrnou produkci buněk. Mutace nebo delece tumor-supresorových genů vedou k potlačení apoptosy, uchovávaní chyb v deoxyribonukleové kyselině (DNA) a k potlačení antiproliferačních účinků. Miss-match repair geny produkují molekuly, které se podílejí na opravách chybných párů bází DNA vzniklých při replikaci. K maligní transformaci je potřeba více zmíněných mutací a chromosomálních aberací v jedné buňce. Takový proces může trvat měsíce až roky a většina z nich se díky včasným reparačním mechanismům neprojeví. Proliferace a migrace neoplastických buněk, tedy buněk maligních, je nepredikovatelná, existuje však spojitost mezi stupněm diferenciaci a invazivitou, kdy je pohyblivost buněk inhibována diferenciací procesy. K aktivnímu přemístování, invazi a infiltraci buněk do okolních zdravých tkání je zapotřebí enzymatického působení (především rozklad mezibuněčné hmoty) a atrofie způsobené tlakem nádorové tkáně [4], [7], [8].

Dalším již zmíněným faktorem pro maligní transformaci je ztráta diferenciaci buněk. Rozhodující roli v tomto procesu hraje redukce buněčných organel, především těch, které se podílejí na syntéze a modifikaci proteinů (ER, Golgiho aparát). Vysvětlením tohoto jevu může být zkrácení postmitotického regeneračního času, jehož následkem dochází k redukci diferenciací času buněk. Vliv mohou mít i defekty genetické informace, které upravují strukturu cytoplazmy, mění intermediáty metabolismu a způsobují tvorbu abnormálního glykogenu. U mnoha typů nádorů se proces diferenciaci liší, všeobecnou charakteristikou jsou změny různých tkáňových struktur (metaplasie (přeměna jedné diferencované tkáně v jinou diferencovanou tkáň), heteroplasie (tvorba určité tkáně na abnormálních místech jiné tkáně)), buněčných struktur a funkcí [7].

Nádorové buňky mají schopnost produkovat určité molekuly, nádorové markery, které se nacházejí jak v jejich membráně, tak v cytoplasmě. Detekce u pacientů může být

z krve, moči či mozkomíšního moku a je velice důležitá pro diagnostiku nádorů či sledování efektu jejich terapie. Mezi markery se řadí různé druhy antigenů, enzymů a hormonů (Tab. 1), které bývají specifické pro určité druhy nádorů, a to jejich nadprodukcí (proliferační markery) či abnormální produkcí (ektopická produkce hormonů, dediferenciační markery). Díky poslednímu zmíněnému jevu se nádorové buňky podobají embryonálním, oba typy produkují onkofetální antigeny jako alfa-fetoprotein a karcinoembryonální antigen. Zvýšená hladina těchto antigenů je pozorována také fyziologicky u těhotných žen. [8].

Tab. 1: Příklady markerů nádorových buněk. Převzato a upraveno z [8].

<b>MOLEKULÁRNÍ TYP</b>	<b>MARKER</b>	<b>TYP NÁDORU</b>
<b>antigeny</b>	karcinoembryonální antigen	karcinomy plic, prsu, pankreatu a pohlavních orgánů
	alfa-fetoprotein	karcinomy varlat, vaječnicků a jater
	tkáňový peptidový antigen	všechny typy nádorů (nespecifické)
	komplexní glykokonjugáty – antigenní determinanty detekovatelné monoklonálními protilátkami	karcinomy prsu, žaludku, pankreatu a vaječnicků
<b>hormony</b>	choriový gonadotropin	choriokarcinom (epitelový nádor vycházející z buněk trofoblastu), nádor varlat, vaječnicků a děložního čípku
	kalcitonin	medulární karcinom
	adrenokortikotropní hormon	karcinom plic
<b>enzymy</b>	alkalická fosfatasa	nádory kostí, jater a placenty
	prostatická kyselá fosfatasa	karcinom prostaty
	prostatický specifický antigen (serinová proteasa)	karcinom prostaty
	laktatdehydrogenasa	leukémie
	neuron-specifická enolasa	neuroblastom, karcinom plic
	thymidinkinasa	všechny typy nádorů (nespecifické)

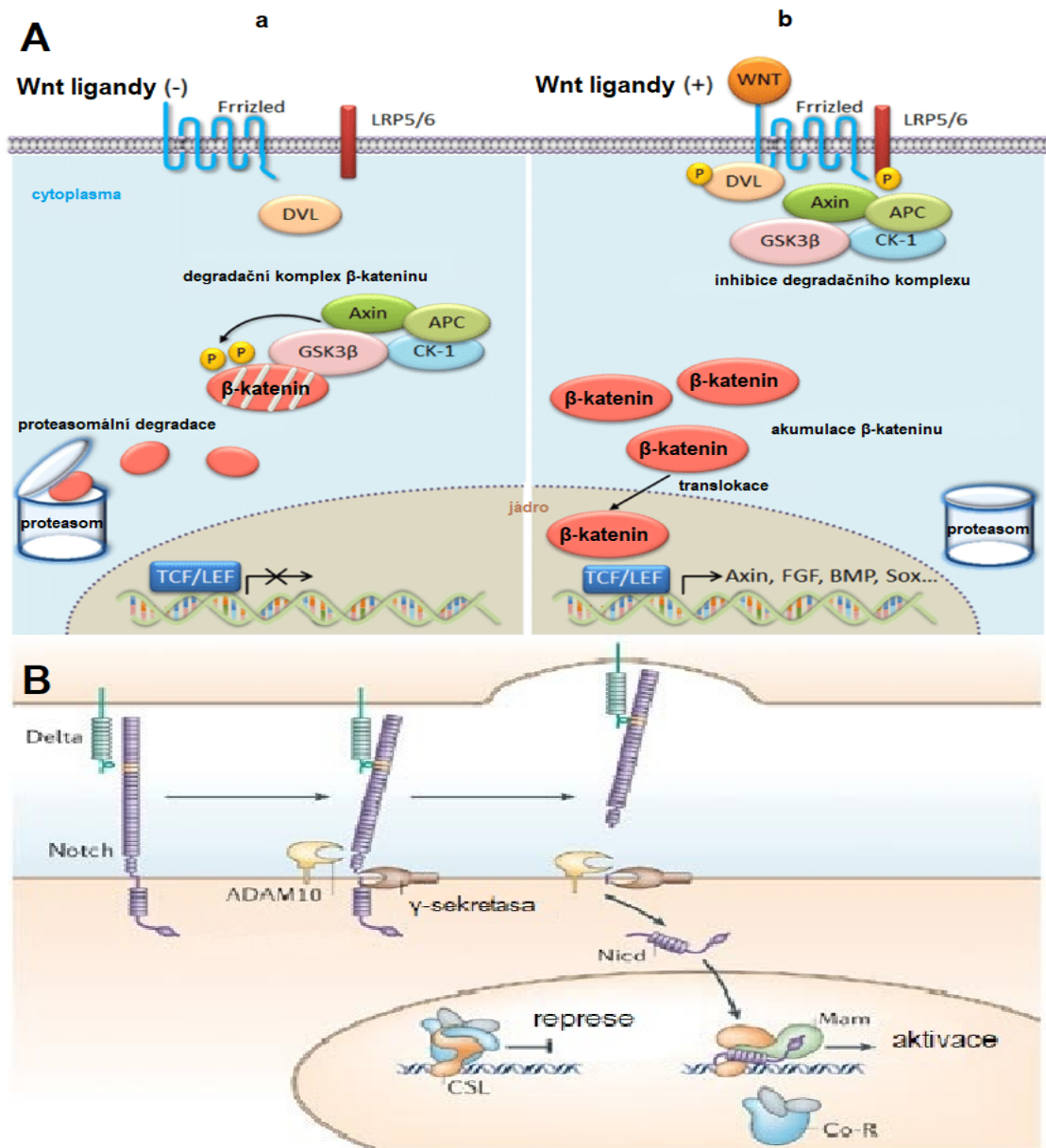
## 1.2.1 Neuroblastom

Neuroblastom (NB) je nejčastější extrakraniální solidní nádor u dětí, vyskytuje se u 10 % dětských onkologických pacientů a je z 15 % příčinou jejich smrti. Třetina pacientů s NB je diagnostikována během prvního roku života, medián diagnostikovaného věku je 22 měsíců. Výjimečně se objevují pacienti s diagnostikovaným NB během adolescence či dospělosti. Častější výskyt NB je pozorován u chlapců než u dívek (1,2 : 1) [10], [11].

Tento embryonální nádor se vyvíjí během fetálního či neonatálního období z primitivních buněk sympatického nervstva vznikajících v neurální liště, která je založena při gastrulaci, tedy asi v třetím týdnu vývoje lidského zárodku. Lokalizace NB je spojena s migrací buněk sympatika v oblasti krční, hrudní a bederní páteře. Nejčastější je výskyt v retroperitoneu (prostor za dutinou břišní) a ve dřeni nadledvin [10]. Na umístění NB má velký vliv vývoj a specializace buněk neurální lišty, kde je klíčové propojení signálních drah transkripčních faktorů kostního morfogenetického proteinu (BMP, z angl. bone morphogenetic protein), signálního glykoproteinu Wnt (z angl. wingless-related integration site), fibroblastového růstového faktoru (FGF, z angl. fibroblast growth factor) a dále signalizace Notch/Delta. Protein BMP pocházející z rodiny růstových faktorů TGF $\beta$  (z angl. transforming growth factor beta) aktivuje přes své receptory transkripční faktory genů zapojených do růstu a diferenciac buněk. Na základě několika studií bylo prokázáno, že raná a konstantní exprese BMP je esenciální pro indukci neurální lišty a že potlačení signálních drah spojených s tímto proteinem vede ke vzniku multipotentních NB [12]–[14]. Wnt je ligand řídící signalizaci  $\beta$ -kateninu – jeho sekrece spouští kaskádu inhibující komplex degradující  $\beta$ -katenin. Ten může následně vstoupit do jádra a v kombinaci s dalšími transkripčními faktory ovlivnit transkripci genů (*Obr. 4A*, str. 19). Wnt signalizace je významná v embryonálním vývoji, kdy reguluje proliferaci buněk a vytváří genové vzory, je důležitá také pro diferenciaci a specializaci buněk neurální lišty [13], [15]. U mnoha typů nádorů (leukémie, kolorektální karcinom, hepatocelulární karcinom) deregulace Wnt signalizace stimuluje proliferaci a zachování kmenových nádorových buněk. Studie zabývající se NB však neprokázaly jednoznačnou úlohu této signalizace v tumorigenezi, v různých neuroblastomových buněčných liniích docházelo po stimulaci Wnt signalizace k vyšší expresi komponent této signální dráhy či dokonce k rezistenci k cytostatiku *in vitro* [16]–[18]. FGF je sekretovaný protein, který předává signál vazbou na receptory

tyrosin kinas, konkrétně přes receptory růstových faktorů fibroblastů (FGFRs, z angl. fibroblast growth factor receptors), čímž se aktivuje několik signálních drah zapojených do proliferace a zachování buněk (např. Ras/ERK a Akt/mTOR) [19]. Deregulace drah spojených s FGF pozitivně ovlivňuje vývoj NB deaktivací Wnt dráhy a transkripčního faktoru STAT3 (z angl. Signal transducer and activator of transcription 3) – důležité molekuly spojené s aktivací a regulací genů zapojených do proliferace, apoptosy a diferenciaci tkání [20]. Notch proteiny jsou transmembránové signální molekuly, které se vazbou na své receptory (Delta) štěpí, vážou transkripční faktory a následně v jádře aktivují transkripci cílových genů (*Obr. 4B*, str. 19). Tyto molekuly kritické pro embryonální vývoj jsou také zahrnuty do mnoha drah stimujících buňky k proliferaci se zablokovanou diferenciací. Studie Notch signalizace u NB prokázala, že inhibice jednoho ze signálních kroků vede k diferenciaci buněk a že inhibitory Notch vedou u NB k potlačení progresu nádoru [21]–[23].

Příčiny vzniku NB nejsou plně známy, k jeho vývoji nebyl přiřazen vliv žádného z faktorů vnějšího prostředí. Onemocnění je sporadické, byly však popsány i případy, kdy se NB objevuje v rodinách jako dědičný (familiární NB), v takových případech byla zjištěna vysoká biologická i klinická heterogenita, pacienti jsou diagnostikováni již kolem 9. měsíce života a onemocnění bývá asociováno s vícečetnými primárními nádory (více synchronních a metastazujících nádorů přítomných v jednom jedinci) nebo jinými vrozenými vadami (např. Hirschsprungova nemoc či vrozená hypoventilace) [10], [11].



Obr. 4: Ukázka signálních drah významných pro vývoj buněk neurální lišty, jejichž defekty mohou mít vliv na vývoj neuroblastomu. A – signální dráha ligandu Wnt (z angl. wingless-related integration site); a – při absenci Wnt ligandu je  $\beta$ -katenin vázán na degradační komplex a poté degradován v proteasomu; b – Wnt ligandy jsou rozpoznávány povrchovými Frizzled receptory, které následně váží degradační komplex  $\beta$ -kateninu, čímž ho inhibují; volný  $\beta$ -katenin se akumuluje v cytoplasmě a následně translokuje do jádra, kde se váže na specifické receptory a aktivuje transkripci genů ovlivňujících růst a diferenciaci buněk. B – Notch/Delta signální dráha; transmembránový Notch protein je rozpoznán Delta receptorem na signální buňce, následně dochází k odštěpení extracelulární části Notch proteinu pomocí ADAM10 a následnému štěpení  $\gamma$ -sekreasou, která uvolňuje intracelulární doménu Nidc (Notch intracellular domain) – tato po vstupu do jádra aktivuje transkripční komplex faktorů podporujících růst a diferenciaci buněk. Převzato a upraveno z [14], [22].

V buňkách NB se vyskytuje řada chromosomálních změn, a to buď hyperplodie, tedy zmnožení celých chromosomů (u NB nejčastěji získá chromosomu 17), nebo různé chromosomální aberace, jako například amplifikace genu *MYCN* a nabytí či ztráta určitých oblastí chromosomů (u NB častý výskyt delece části krátkého raménka chromosomu 1), které jsou spojené s horší prognózou. U familiárního NB byla pozorována častá mutace genu kinasy anaplastického lymfomu (*ALK*, z angl. anaplastic lymphoma kinase), jehož exprese je důležitá pro neurální diferenciaci, proliferaci a přežití. Maligní transformace bývá spojena s mutací *ALK*, jejímž výsledkem je odlišná kinasová aktivita. Na tomto chromosomu je dále amplifikován protoonkogen *MYCN*, biomarker používaný pro stratifikaci NB. Amplifikace *MYCN* je definována jako deset či více kopií tohoto genu na jádro, přičemž nádory s menším počtem kopií patří mezi méně agresivní formy NB [24]. Popisovaná oblast chromosomu 2 kóduje kromě *MYCN* ještě několik transkripčních faktorů, jejichž nadměrná exprese vede k proliferaci a deregulovanému růstu buněk [11], [25].

NB může být klasifikován dle stupně diferenciaci (nediferencovaný, slabě diferencovaný, diferencovaný) nebo dle stupně MKI (z angl. mitosis-karyorrhexis index), tedy z měření proliferace buněk zahrnující buňky v mitotickém stavu (dělicí se) a buňky ve stavu karyorhexe (rozpad jádra) na 5000 buněk. Histologicky se u NB vyskytuje omezená produkce Schwannových buněk, buňky mají chudé stroma (část nádoru obsahující vazivovou tkáň a cévy sloužící jako opora nádoru a výživa) a jsou bohaté na neuroblasty. K predikci prognózy se využívá systému „*The International Neuroblastoma Pathology Classification*“, který zahrnuje stupeň diferenciaci buněk, MKI a přítomnost Schwannových buněk. Dále jsou pacienti s NB děleni do tří rizikových skupin (nízké, střední a vysoké riziko) v závislosti na věku pacienta při diagnostikování nemoci, histopatologii nádoru, indexu DNA, stádia INSS (z angl. International Neuroblastoma Staging System) (Tab. 2, str. 21) a stupně amplifikace *MYCN* [11], [26], [27].

Pacienti s NB mohou vykazovat symptomy jako malátnost, horečky a ztrátu tělesné váhy, dále je možný rychlý nárůst nádorové hmoty spojený s bolestí, pacienti mohou být ale také plně asymptomatictí [10]. Diagnostikování NB zahrnuje vyšetření hladiny metabolitů katecholaminů (dopamin, kyselina vanilmandlová a homovanilová – nádorové biomarkery) v moči, zvýšení nespecifických biomarkerů jako laktátdehydrogenasa, ferritin a neuron-specifická enolasa. K následnému potvrzení diagnózy či k bližšímu prozkoumání nádorové hmoty slouží zobrazovací metody jako ultrasonografie, výpočetní tomografie (CT, z angl. computed tomography) či magnetická

rezonance pacienta. Definitivně určí diagnosu histopatologické vyšetření vzorku tkáně nádoru [11], [28].

Tab. 2: Rozdělení pacientů s neuroblastomem na základě klinických a biologických vlastností nádoru – dle INSS. Převzato a upraveno z [10].

STÁDIUM	CHARAKTERISTIKA
1	tumor lokalizovaný, ohraničený na anatomický útvar, lze jej kompletně odstranit; ipsilaterální a kontralaterální lymfatické uzliny nejsou mikroskopicky zasaženy nádorem
2A	unilaterální tumor po neradikální resekci; ipsilaterální a kontralaterální lymfatické uzliny nejsou mikroskopicky zasaženy nádorem
2B	unilaterální tumor částečně či kompletně odstraněný; ipsilaterální lymfatické uzliny s pozitivním nálezem, kontralaterální lymfatické uzliny nezasážené
3	tumor infiltrující přes střední čáru s možným zasažením místních lymfatických uzlin; lokalizovaný unilaterální tumor se zasaženými kontralaterálními lymfatickými uzlinami nebo středočárový tumor s bilaterálním postižením lymfatických uzlin
4	rozšíření primárního tumoru do vzdálených lymfatických uzlin, kostí, kostní dřeně, jater, kůže či jiných orgánů
4S	lokalizovaný primární tumor, omezeně se rozšiřující do kůže, jater a kostní dřeně (pouze u pacientů ve věku do 1 roku) a bez amplifikace <i>MYCN</i>

### 1.3 Protinádorová terapie

V současnosti je při léčbě zhoubných nádorů k dispozici více léčebných postupů (operační léčba, chemoterapie, radioterapie, hormonální terapie, cílená tzv. biologická léčba a imunoterapie), které se kombinují. Pro výběr nejvhodnějšího postupu je nezbytné prvotní vyšetření všech charakteristik nádoru – histologický typ, lokalizace, agresivita, dediferenciace, proliferace a rozsah nádoru, ale i vlastnosti pacienta jako jsou věk, jiná onemocnění, jeho osobní preference a sociální faktory. Dále je nutné sledovat průběh léčby pacienta v pravidelných intervalech a pokud možno stále stejnými metodami a na stejném pracovišti (každá laboratoř má určené referenční meze pro vyšetřované faktory, které se mohou mezi sebou mírně lišit) [5].

Onkologická léčba se skládá ze dvou neoddelitelných složek, protinádorové léčby a podpůrné péče. První složka se zabývá přímo daným nádorem, jeho zmenšením, odstraněním, zastavením růstu či metastazování, k tomuto účelu bývá využito chirurgických zákroků (pouze u solidních nádorů), radioterapie, systémové terapie nebo jejich kombinací v závislosti na stádiu pacienta a vlastnosti nádoru. Druhá složka, tedy podpůrná péče, se věnuje problémům, které jsou k nádoru přidružené, jako bolest, výživa, psychika pacienta nebo vedlejšími účinky protinádorové léčby (nevolnost, toxicita, která může vyvolat až selhání postižených orgánů, infekce a krvácení vyvolané poškozením krvetvorby) [5].

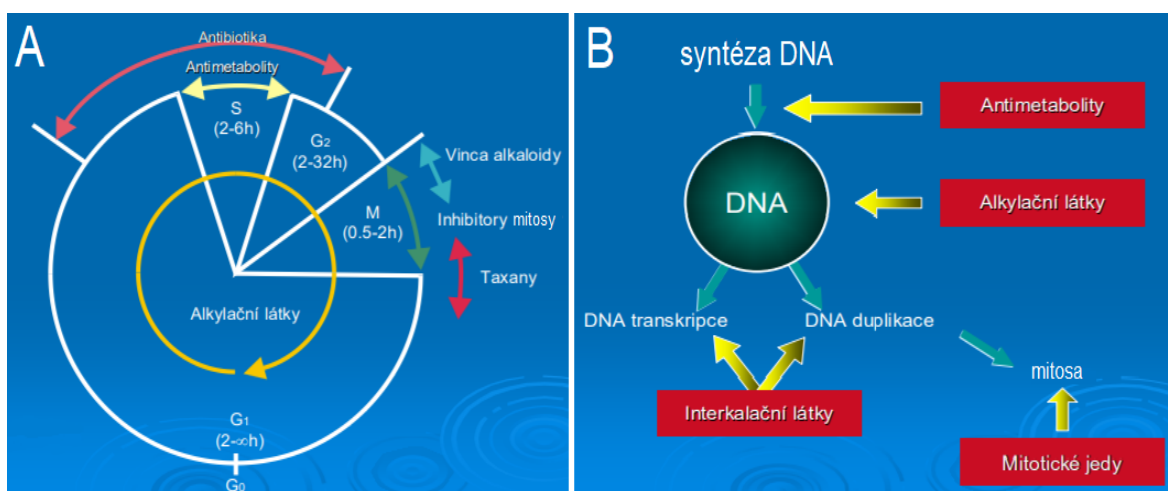
Radioterapie využívá ionizujícího záření, tedy záření s vysokou energií schopného vyřádit elektrony z atomového obalu a tímto látky ionizovat. Při ozařování nádorových buněk je klíčovým cílem především DNA, která může být poškozena přímo fotony nebo nepřímo vznikajícími volnými radikály z molekul vody. Předpokládaným poškozením je denaturace DNA, porušení vodíkových vazeb a zlomy na jednom či obou vláknech DNA. Všechny zmíněné defekty jsou pro buňku ohrožující, proto musí dojít k bezprostřednímu zahájení opravných mechanismů, jinak je indukovaná apoptosa (programovaná buněčná smrt). Nádorové buňky mají často defektní reparační schopnosti, ozáření je pro ně tedy fatální. Možnost aplikovat pro nádor letální dávku záření bývá omezována tolerancí zdravých tkání v okolí nádoru – u nich se ale předpokládá funkčnost reparačního aparátu, tedy schopnost vzniklá poškození opravit [4].

Jak již bylo výše uvedeno, k postupům systémové terapie patří cílená léčba, hormonální terapie, imunoterapie a chemoterapie. Cílená léčba a hormonální terapie jsou založené na podobných principech, obě cílí na specifické struktury nádorových buněk. V prvním případě jde o zablokování určité signální kaskády, jejímž koncovým efektem je buněčná proliferace, dediferenciace, chemorezistence či metastazování. Do organismu jsou vpraveny látky (molekuly), které mají vyšší afinitu k cílové struktuře než molekuly tělu vlastní, a tím dochází k znemožnění buněčné signalizace, povrchové struktury (receptory) mohou být blokovány monoklonální protilátkou. Nejčastěji jsou cílené receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR, z angl. epidermal grow factor receptor), cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR, z angl. vascular endotelial grow factor receptor), protein kinasy mTOR (z angl. mechanistic/mammalian target of rapamycin), cyklin dependentní kinasy 4/6, kinasy ALK či kinasy fosfatidylinositol-3 (PI3K). Cílená léčba nebývá vždy úspěšná ze dvou důvodů – cílený receptor nemusí být vždy funkční nebo dojde k alternativní cestě aktivace cílené signální dráhy. Podmínkou

pro využití hormonální terapie je přítomnost hormonálních receptorů na nádorových buňkách (receptorů, na které se jako ligandy váží hormony). Efektivita metody závisí na obsazení či zaslepení tohoto receptoru nebo na znemožnění produkce příslušného hormonu. Ve většině případů jsou podávány estrogény, androgeny, glukokortikoidy či molekuly s nimi kompetující o vazné místo na receptoru. Imunoterapie využívá přirozeně se vyskytujících komponent imunitního systému pacienta, především T-lymfocytů, kterým jsou v lymfatických uzlinách prezentovány antigeny spojené s tumorem nebo tzv. neoantigeny, které jsou specifické pro nádorové buňky, protože vznikají genetickými mutacemi během onkogeneze. Pokud aktivované T-lymfocyty rozpoznají nádorovou buňku, naváží se na ni a spustí další kroky, které usmrtí buňku a tím vyplaví další antigeny, které posílí imunitní odpověď. V klinické praxi se v onkologii využívá více imunoterapeutických postupů najednou – vakcíny dendritických buněk (složka vrozené imunity), upravené T-lymfocyty produkující specifický receptor pro daný antigen (tzv. CAR-T lymfocyty), interferony (bílkoviny zprostředkovávající imunitní odpověď) a monoklonální protilátky inhibující checkpointy imunitní odpovědi cytotoxického proteinu asociovaného s T-lymfocyty (CTL4 A, z angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 A) a molekuly PD (z angl. programmed cell death), tedy receptorů, které zajišťují imunitní toleranci [4].

Chemoterapie patří mezi základní postupy při léčbě nádorů, často je kombinována s jinými léčebnými postupy, a to především pro neselektivitu a toxicitu používaných cytostatik. Možnost aplikace chemoterapie pacientovi a její efektivita závisí především na druhu nádoru a stavu pacienta, heterogenitě a počtu nádorových buněk, jejich citlivosti k léčbě a schopnosti vzniku sekundární (získané) rezistence. Používání cytostatik vyžaduje prvotní studium jejich farmakologických vlastností, znalost mechanismu účinku, vazby na endogenní molekuly, distribuce v organismu, biotransformace v aktivní či naopak neúčinnou látku, znalost toxicity, cesty vylučování a místo možného hromadění. Chemoterapeutika můžeme rozřadit do skupin dle mechanismu účinku (*Obr. 5B*, str. 24) na látky inhibující syntézu (antimetabolity, analoga pyrimidinu, purinu, cytidinu a kyseliny listové) nebo porušující strukturu nukleových kyselin (látky interkalační, alkylační a štěpící molekulu DNA, inhibitory topoisomerasy), látky měnící strukturu mikrotubulů během mitosy (inhibitory polymerace a depolymerace), látky porušující syntézu bílkovin a látky s kombinovanými účinky. Jednotlivá cytostatika působí na buňky v různých fázích buněčného cyklu (*Obr. 5A*, str. 24), z toho vyplývá jejich poměrně omezená efektivita, kterou nelze kompenzovat vysokou dávkou pro

zvýšení toxicity, ale vhodným načasováním, které zvyšuje pravděpodobnost výskytu buněk ve vyžadované fázi buněčného cyklu. Již výše zmíněná neselektivita chemoterapie s sebou nese řadu vedlejších účinků, které jsou spojené především s vlivem cytostatik na rychle se dělící buňky, to mohou být například buňky povrchových epitelů sliznic a krvetvorné kmenové buňky v kostní dřeni. Každé cytostatikum má i specifické vedlejší účinky, které mohou být spojené s jejich metabolismem v organismu (nefrotoxicita, plicní fibrosa, průjmy, kardiotoxicita, nefrotoxicita, neurotoxicita, sterilita, lokální reakce a jiné) [4].



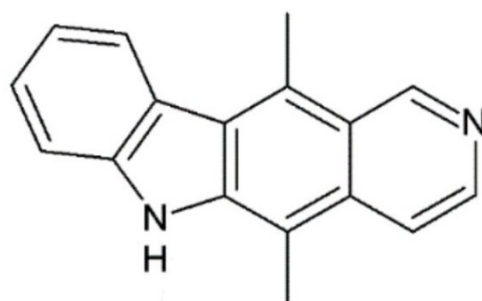
Obr. 5: Mechanismus účinku cytostatik. A – působení jednotlivých skupin cytostatik v průběhu buněčného cyklu; B – působení různých druhů cytostatik v závislosti na jednotlivé fáze DNA. Převzato a upraveno z [4].

### 1.3.1 Ellipticin

Ellipticin je alkaloid přirozeně se vyskytující ve stonku, listech a kořenech rostlin z čeledi toješťovitých rostoucích v oblasti Indického oceánu [29]. Spolu se svými deriváty vykazuje protinádorovou a anti-HIV aktivitu, není hematotoxický a jeho celková toxicita je nízká, z tohoto důvodu je vhodný pro klinické účely. Přesný mechanismus účinku zatím nebyl přesně popsán, bylo ale prokázáno, že jeho protinádorová aktivita spočívá především ve schopnosti interkalace do dvoušroubovice DNA (dáno strukturně (Obr. 6, str. 25) – velikost a tvar ellipticinu připomíná strukturu páru bází purinu-pyrimidinu, proto do dvoušroubovice dobře zapadá, dále jeho aromatický charakter přispívá k hydrofobním interakcím) a v inhibici aktivity DNA topoisomerasy II (tvorba kovalentních vazeb, především u hydroxy-derivátů ellipticinu) [30]–[32]. U buněk

adenokarcinomu prsu, leukemií, glioblastomu a neuroblastomu dochází k aktivaci ellipticinu cytochromy P450 nebo peroxidasami a k následné tvorbě kovalentních aduktů s DNA, které mohou přispívat k jeho protinádorovým účinkům [33]. Ellipticin *in vitro* zastavuje růst buněk přerušáním G2/M fáze buněčného cyklu především regulací exprese proteinu p53, cyklinu B1 a cyklin-dependentní kinasy 2 [33], [34].

Obsah molekuly chromoforu umožňuje jeho lokalizaci v buňce. Vzhledem k lipofilně-bazickému charakteru struktury se přirozeně váže na kyseliny v buňce (např. DNA) a také vstupuje do kyselých organel. Právě tento jev – hromadění ellipticinu v lysosomech – přispívá ke vzniku chemorezistence nádorových buněk vůči tomuto cytostatiku [35].



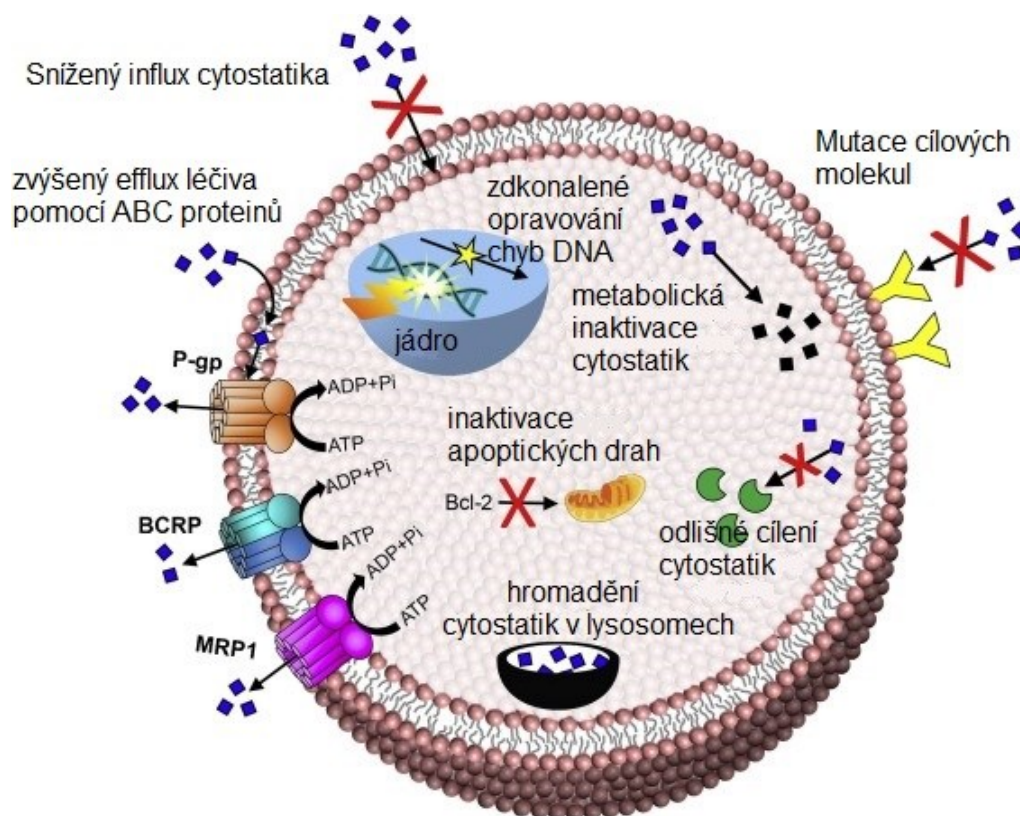
Obr. 6: Struktura ellipticinu. Převzato a upraveno z [32].

## 1.4 Rezistence

Nádory jsou tvořeny heterogenní populací buněk, které jsou různě citlivé vůči různým lékům. Kromě samotných nádorových buněk je pro danou populaci důležité i jejich mikroprostředí a cévní zásobení. Právě z důvodu heterogenity nádorových buněk můžeme během léčby pozorovat tzv. primární rezistenci – zachování malého procenta dané populace, která je ke zvolené terapii necitlivá. Primární rezistenci způsobují nejčastěji nádorové kmenové buňky, které se dokáží mnoha mechanismy bránit poškození. Během léčby dochází také ke vzniku selekčního tlaku, kterým jsou citlivé buňky odstraňovány, rezistentní buňky jsou však zachovány a mají možnost podléhat dalším mutacím, kterými mohou vznikat agresivnější a více rezistentní formy nádoru. Takto vzniká sekundární rezistence. Pokud nádorové buňky odolávají více druhům cytostatik, které působí různými mechanismy a mají odlišnou chemickou strukturu,

mluvíme o mnohočetné lékové rezistenci (MDR, z angl. multiple drug resistance) [5], [35].

Bylo odhaleno již mnoho mechanismů, které jsou ve vzájemné spolupráci příčinou vzniku rezistence (*Obr. 7*). Mezi obecně známé patří farmakokinetické změny (zvýšený efflux či snížená resorpce léčiva, odlišný metabolismus cytostatik v nádorové buňce), změny na molekulární úrovni (deregulace, zvýšená exprese či modifikace cílových molekul nebo molekul nezbytných pro mechanismus účinku cytostatik), změny v metabolismu léčiva (modifikace klíčových enzymů), změny v životním cyklu buněk (přechod do G0 fáze, ve které jsou buňky k cytostatiku nejméně citlivé), omezení přístupnosti léčiva do cílových struktur buňky (nejčastějším cílem je jádro) či k samotným nádorovým buňkám přes bariéry v organismu a také mikroprostředí schopné inaktivovat cytostatikum či produkovat faktory podporující dráhy důležité pro přežití nádorových buněk [5], [35], [36].



*Obr. 7:* Schéma vybraných mechanismů rezistence k cytostatikům v nádorové buňce. Převzato a upraveno z [37].

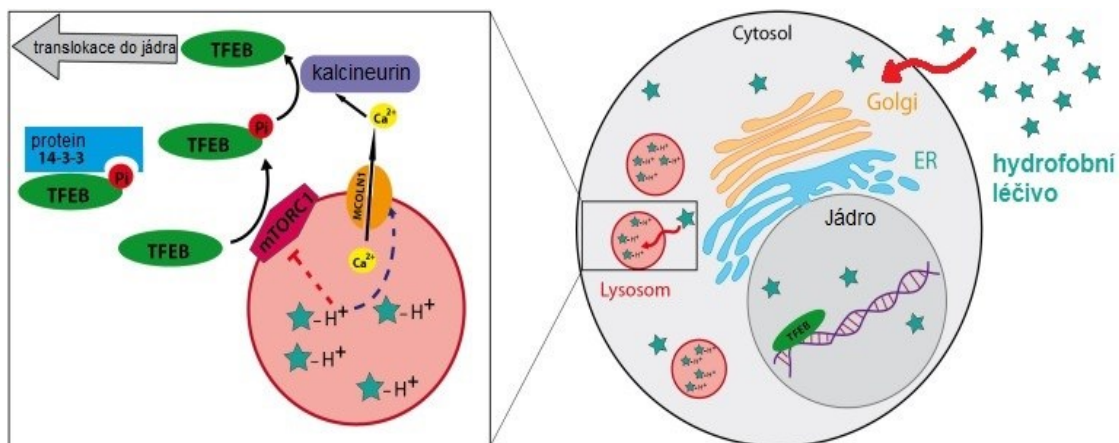
Molekulární mechanismy chemorezistence zahrnují funkci onkogenů, tumor-supresorových genů, transportních proteinových pump, mechanismy oprav DNA (nežádoucí u chyb v DNA způsobených zásahem cytostatika), vlastnosti nádorových kmenových buněk (již zmíněno výše), exosomy (mikrovezikuly, kterými je z donorových nádorových buněk přenášén určitý obsah do akceptorových buněk, tímto mechanismem je kontrolováno a řízeno mnoho drah ovlivňujících růst, vývoj buňky, metastazování a chemorezistenci nádoru), autofágii (degradaci poškozených organel či partikul, adaptace vede k vyššímu přežívání buněk) a epiteliálně-mesenchymální tranzici (EMT, proces, během kterého epiteliální buňky získávají vlastnosti multipotentní mesenchymální kmenové buňky s vysokou invazivitou a s rezistencí k apoptose i k léčbě). Mezi nejvýznamnější onkogeny zapojené do chemorezistence patří receptor epidermálního růstového faktoru, který aktivuje mnoho drah ovlivňujících buněčnou diferenciaci, proliferaci, transformaci a přežívání (např. JAK/stat3, PI3K/Akt/mTOR aj.) a jehož zvýšená exprese vede k aktivaci faktorů podporujících vznik chemorezistence. Příkladem takového faktoru může být transkripční faktor NF- $\kappa$ B, který po aktivaci vstupuje do jádra a spouští transkripci molekul inhibujících apoptosu buněk. Vliv tumor-supresorového genu na vznik rezistence byl potvrzen u nádoru varlat léčeného cisplatinou, kde jsou apoptické dráhy indukované tímto cytostatikem závislé na funkci proteinu p53. V neposlední řadě jsou ve vývoji chemorezistence významné ABC transportéry (z angl. ATP binding cassette), tedy transmembránové proteiny, které zajišťují transport různých substrátů (včetně cytostatik) z buněk nebo buněčných kompartmentů – jejich vyšší exprese bývá prokázána v nádorových buňkách a potvrzen byl i efflux cytostatik z buňky [35]–[37].

Dalším způsobem, jakým si nádorová buňka zajišťuje chemorezistenci, je zapojením lysosomů. Lysosomy jsou intracelulární organely sloužící k přenosu a uchování mnoha hydrolytických enzymů a proteinů asociovaných s membránou. Jejich struktura, počet a funkce se liší v závislosti na typu buněk, vyskytují se ale ve všech eukaryotických buňkách vyjma červených krvinek. Jsou charakteristické velmi kyselým vnitřním prostředím ( $\text{pH} \leq 5$ ), které je zprostředkované aktivitou vakuolární  $\text{H}^+$ -ATPasy (V-ATPasy). Lysosomy se mimo jiné zapojují i do mnoha fyziologických procesů zahrnujících rozklad makromolekul, endocytosu, opravy plasmatické membrány, udržení homeostasy klíčových metabolitů jako je cholesterol nebo aminokyseliny a také apoptosu [38], [39]. Bylo zjištěno, že lysosomy prochází změnami asociovanými s maligní transformací buněk, včetně zvýšené exprese proteinů podporujících progresi

a metastazování nádoru či snížené exprese proteinů důležitých pro apoptickou dráhu zprostředkovanou lysosomy [40].

Mechanismus, kterým lysosomy přispívají k mnohočetné lékové rezistenci, je označován jako lysosomální sekvestrace, tedy zachycení a hromadění hydrofobních slabých bází, které volně procházejí lipidickými membránami, v lysosomech – zde jsou látky protonovány, čímž je znemožněn jejich další samostatný pohyb, a tak se nedostanou do místa svého účinku (*Obr. 8, str. 29*) [41]. Lysosomální sekvestrace byla pozorována i u několika protinádorových léčiv, jejich cytotoxický efekt je signifikantně snížený a dochází k rozvoji lékové rezistence [42], [43]. Dále bylo zjištěno, že po inkubaci s protinádorovými léčivy, které mají schopnost se akumulovat v lysosomech, dochází v nádorových buňkách ke zmnožení lysosomů. Tento jev je podmíněn translokací transkripčního faktoru EB (TFEB) z cytoplasmy do jádra. Aktivita TFEB je řízena fosforylací komplexem mTORC1 (z angl. mammalian target of rapamycin complex 1) a defosforylací kalcineurinem ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní proteinová fosfatasa): v případě, že je TFEB fosforylován, dochází k jeho vazbě na protein 14-3-3 a retenci komplexu v cytoplasmě; pokud se ale uvolní  $\text{Ca}^{2+}$  ionty z lysosomů, dojde k aktivaci kalcineurinu, který defosforyluje TFEB, tím ho aktivuje a umožní translokaci do jádra (*Obr. 8, str. 29*). Lysosomální sekvestrace tedy indukuje aktivitu TFEB, a to potlačením mTORC1 aktivity nebo zvýšením aktivity kalcineurinu. Následná biogenese lysosomů zvýší sekvestraci léčiv a podpoří vývoj mnohočetné lékové rezistence [43], [44].

Pro lysosomální sekvestraci je velice důležitý pH gradient mezi cytoplasmou a lysosomy – léková rezistence u nádorových buněk není závislá pouze na již zmíněné *de novo* biogenesi lysosomů, ale také na jejich dostatečné acidifikaci [45]. Například u neuroblastomové linie rezistentní k ellipticinu (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>) byla zjištěna zvýšená exprese vakuolární  $\text{H}^+$ -ATPasy, tedy membránového proteinu důležitého pro správnou acidifikaci lysosomů, se kterou úzce souvisí mechanismus sekvestrace – po inhibici tohoto proteinového komplexu bafilomycinem dochází po přidavku ellipticinu ke spuštění apoptických drah, lysosomální sekvestrace v této buněčné linii tedy zajišťuje rezistenci k ellipticinu [46]. U dalších nádorových linií byla popsána mnohočetná léková rezistence způsobená aktivní lysosomální sekvestrací, která byla zprostředkována ABC transportéry (např. P-glykoproteinem) v membránách lysosomů [47].



Obr. 8: Pasivní lysosomální sekvestrace hydrofobních slabých bází/léčiv (vpravo) indukovaná aktivací transkripčního faktoru EB (TFEB) a lysosomální biogenesí (vlevo). Hydrofobní slabé báze volně difundují přes plasmatickou membránu a akumulují se vlivem protonace v lysosomech – jejich koncentrace v cytoplasmě i v jádru je redukována. Zároveň dochází k indukci biogeneze lysosomů *de novo* translokací TFEB do jádra. TFEB je fosforylován komplexem mTORC1 (z angl. mammalian target of rapamycin complex 1) a následně v cytoplasmě udržován v inaktivní formě vazbou na protein 14-3-3. Uvolněním  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z lysosomů dochází k aktivaci kalcineurinu, který defosforylací aktivuje TFEB a umožní jeho translokaci do jádra. Převzato a upraveno z [44].

## 1.5 Vakuolární $\text{H}^+$ -ATPasa

Vakuolární  $\text{H}^+$ -ATPasa (V-ATPasa) je enzymový komplex složený z více podjednotek, který se vyskytuje ve všech eukaryotických buňkách. Prvně byl identifikován v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* a ve vakuolách rostlin. Strukturně se ale v každém organismu mírně liší. Tato rotující ATP-dependentní protonová pumpa je zásadní pro acidifikaci mnoha buněčných organel, udržování stálého vnitřního prostředí buňky a funkci několika signálních drah. V živočišných buňkách bývá V-ATPasa lokalizována také v plasmatické membráně, kde je zapojena do obnovy kostní tkáně, maturace spermií a acidifikace moči. Abnormální aktivita V-ATPasy je u lidí možným projevem některých chorob a u nádorových buněk může být též příčinou rezistence k léčbě, proto je tento komplex zkoumán jako terapeutický cíl [48], [49].

### 1.5.1 Struktura vakuolární $\text{H}^+$ -ATPasy

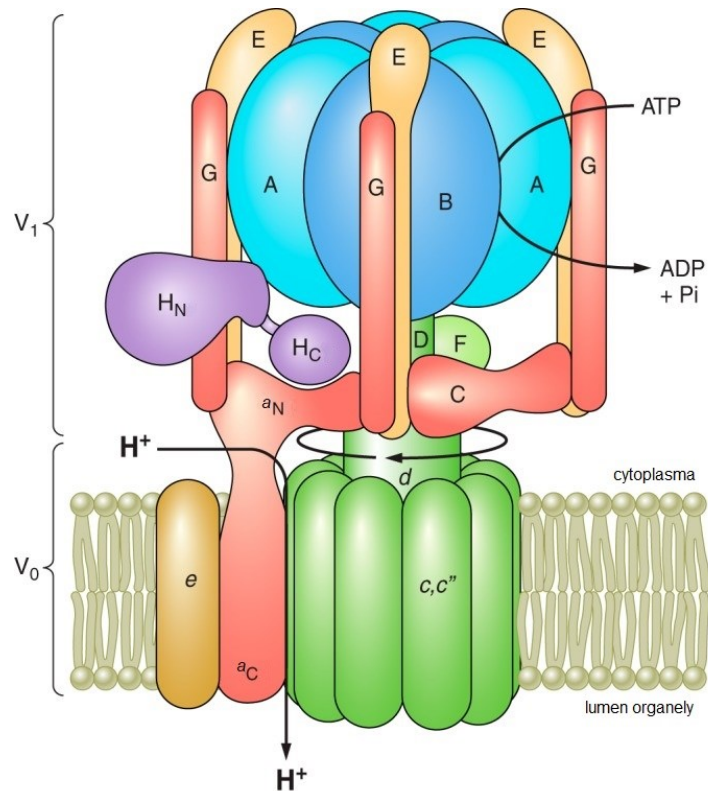
Eukaryotická V-ATPasa je velký enzymový komplex složený ze 13 různých podjednotek, které lze rozdělit do dvou domén (Obr. 9, str. 31). Periferní (cytoplasmatická)  $V_1$  doména

složená z osmi podjednotek (značené velkými písmeny) ve stechiometrii  $A_3B_3CDE_3FG_3H$  slouží k hydrolytickému štěpení ATP. Uvolněná energie je použita k transmembránovému přenosu protonů, který je zprostředkovaný integrální (membránovou) doménou  $V_0$  složené z pěti podjednotek (značené malými písmeny) ve stechiometrii  $ac_9c''de$ . Domény jsou vzájemně propojené „spojovacími částmi“, které regulují aktivitu celého komplexu. Rozlišujeme zde centrální stonek (podjednotky D, F, d), centrální kruh (podjednotky c, c'') a periferní stonek (podjednotky E, G, C, H, e, a) [50], [51].

Periferní doména  $V_1$  je složena z podjednotek A–H o molekulárních hmotnostech 70–100 kDa. Nejvýraznější částí této domény je hexamer  $A_3B_3$ , který obsahuje na rozhraní každé A a B podjednotky vazebné místo pro nukleotid (ATP), dále 3 katalytická místa (převážně na A podjednotkách) zodpovědná za štěpení ATP a s tím spjaté uvolnění energie a 3 „nekatalytická“ místa (převážně se nacházející na B podjednotkách), jejichž funkce je pravděpodobně regulační [52]. Zbylé podjednotky ( $CDE_3FG_3H$ ) tvoří jednu centrální ( $V_1D$ ,  $V_1F$ ) a tři periferní části (heterodimery  $V_1E$ – $V_1G$ ,  $V_1C$ ,  $V_1H$ ) připomínající stonky. Jak již bylo zmíněno, tyto podjednotky slouží k propojení  $V_1$  a  $V_0$  domény – mají tedy důležitou regulační funkci (viz kapitola 1.5.3 Regulace vakuolární  $H^+$ -ATPasy, str. 34). Podjednotka  $V_1C$  je položena paralelně s  $V_0$  doménou a propojuje dva EG heterodimery. Pro složení celého komplexu je velmi významná podjednotka  $V_1H$ , která svým C-koncem interaguje s  $V_0a$  podjednotkou, naopak N-konec má volný a dobře přístupný pro vazbu jiných proteinů. Podjednotky  $V_1D$  a  $V_1F$  tvoří dlouhý centrální stonek, který spojuje hexamer  $A_3B_3$  s membránovou doménou přes  $V_0d$  podjednotku [50], [53].

Membránová doména  $V_0$  se skládá z desetičlenného proteolipidického kruhu  $c_9c''$ , který zajišťuje transport protonů – každá z podjednotek obsahuje glutamovou kyselinu podstupující reverzibilní protonaci, čímž je umožněn zmíněný transport [54]. Rotace kruhu v důsledku štěpení ATP je způsobena rotací centrálního stonku, v membránové části především podjednotkou  $V_0d$ . Transmembránový protein  $V_0a$  propojuje svou N-koncovou částí mnoho podjednotek V-ATPasy ( $V_1C$ ,  $V_1H$  a heterodimery  $V_1E$ – $V_1G$ ), významný je i C-konec, který obsahuje dva protonové kanály procházející membránou – protony vstupují z cytoplasmy do prvního kanálu a protonují glutamovou kyselinu na proteolipidickém kruhu, pomocí rotace dochází dále k interakci s pozitivně nabitými argininy, protony jsou uvolněny do druhého kanálu a transportují se do lumen

organel [55]. Určité typy V-ATPas dále interagují s mnoha různorodými skupinami proteinů, například s proreninovým receptorem (PRR) či s enzymy aldolasou a fosfofruktokinasou [51], [56], [57].



*Obr. 9:* Struktura a základní mechanismus vakuolární  $H^+$ -ATPasy (V-ATPasy). V-ATPasa je složena ze 13 podjednotek uspořádaných do dvou domén – periferní  $V_1$  (podjednotky A-H) hydrolyzující ATP a integrální  $V_0$  (podjednotky a, c, c', d, e) zajišťující transport protonů  $H^+$ . Hydrolýza ATP probíhá na vnitřní straně hexameru  $A_3B_3$  a řídí rotaci centrální části komplexu složené z podjednotek  $V_1D$ ,  $V_1F$  a  $V_0d$ . Následná rotace proteolipidického kruhu  $c_9c'$   $V_0$  domény řídí transport protonů z cytoplasmy do lumen organel přes transmembránové kanály tvořené podjednotkou  $V_0a$ . Katalytická hlava  $A_3B_3$  je stabilizována heterodimery EG  $V_1$  domény, které jsou propojené podjednotkami  $V_1C$ ,  $V_1H$  a  $V_0a$ . Převzato a upraveno z [51].

## 1.5.2 Funkce vakuolární $H^+$ -ATPasy

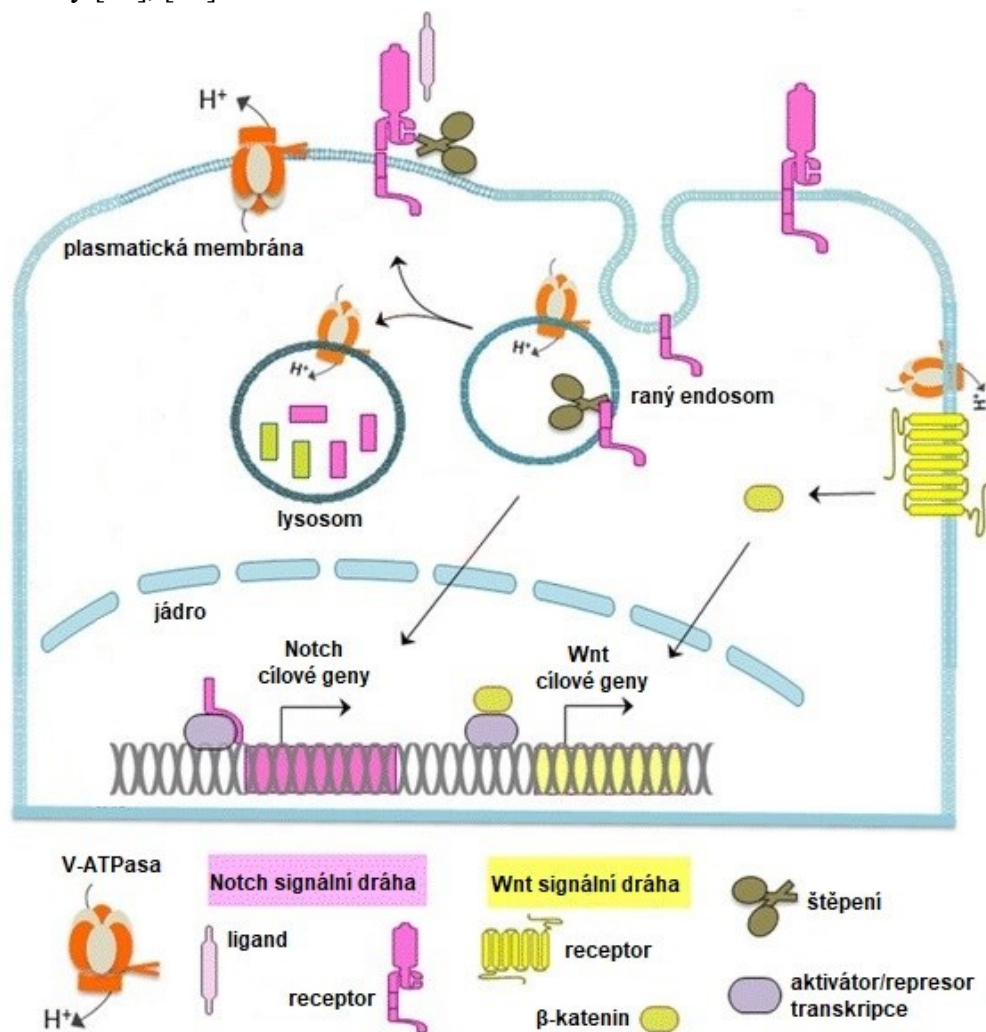
V-ATPasa je v mnohých buněčných membránách využívána jako ATP-dependentní protonová pumpa, která okyseluje vnitřní prostředí organel (např. endosomů, lysosomů, sekretorních vezikul i vezikul pocházejících z Golgiho aparátu) i cytoplasmu buňky. Nízké pH v těchto organelách způsobuje aktivaci receptorů a disociaci vezikul transportujících enzymy nebo spouští degradační dráhy aktivací specifických enzymů.

Vzniklý pH gradient je využíván také pro translokaci malých molekul a iontů [58]. V plasmatické membráně je V-ATPasa zapojena do fyziologických i do patologických procesů – v distálním tubulu se podílí na sekreci protonů do moči a tím regulaci pH plasmy, v osteoklastech dodává buňkám schopnost degradace kostí, zapojuje se do udržování homeostasy v makrofázích a neutrofilech a přispívá k invazivitě nádorových buněk [51], [53], [59]–[61].

V nádorových buňkách ovlivňuje V-ATPasa buněčnou smrt, signalizaci, vznik rezistence k cytostatikům i metastazování. Nádorová tkáň je mimo jiné specifická vysokou aciditou, cytosol buněk si však musí udržovat neutrální pH – k tomuto účelu bývá v tumorech zvýšená exprese V-ATPasy, která zajišťuje alkalizaci cytosolu a acidifikaci organel. V plasmatické membráně V-ATPasa acidifikuje extracelulární prostor [62], [63]. Tímto způsobem se nádorové buňky vyhýbají apoptose, získávají chemorezistenci, zároveň více proliferují, migrují a jsou invazivnější. Viabilita buněk je závislá na V-ATPase, její pozměněná aktivita nebo zvýšená či snížená regulace vede k apoptické buněčné smrti [62], [64]. Dalším důležitým procesem pro přežívání buněk je autofágie, degradační proces využívaný při buněčném stresu a hladovění, během kterého jsou tvořeny autofagosomy transportující obsah k degradaci do lysosomů. Aktivita V-ATPasy je v tomto případě potřebná pro funkci degradačních kyselých hydrolas v lysosomech [51], [65].

Tumorigeneze a progresse nádoru je závislá na ztrátě homeostasy, tedy na poruše sítě buněčné signalizace, kterou V-ATPasa kontroluje přímo i nepřímo, a to především změnou pH vezikul pro aktivaci signalizačních drah Notch a Wnt (*Obr. 10*, str. 33), dále mTOR, receptorů spřažených s G-proteiny a receptorů tyrosinových kinas [51]. Notch signalizace kontrolující proliferaci buněk během jejich vývoje, která je také spojena se schopností tumorů metastazovat, závisí na endolysosomální dráze [51], [66]. V-ATPasa acidifikuje jak endosomy, kde je Notch aktivována, tak lysosomy, kde dochází k degradaci této signální dráhy. Regulace aktivity může být však i opačná, podáním látek spouštějících degradaci Notch je V-ATPasa přesměrována z endoplasmatického retikula na lysosomy [67], [68]. Signální dráha Wnt je evolučně stará a konzervovaná dráha, která reguluje důležité fáze životního cyklu buněk, jejich migraci, diferenciaci a polaritu. Častým následkem deregulace Wnt dráhy je zvrát zdravých buněk v nádorové [69]. V kaskádě této dráhy dochází k již zmíněné interakci PRR s V-ATPasou, která je předposledním krokem k aktivaci  $\beta$ -kateninu, tedy finálního signálního mediátoru [70]. Bylo zjištěno, že inhibicí V-ATPasy je buněčná odpověď na Wnt signalizaci snížena

a dále, že V-ATPasa reguluje tuto dráhu i nepřímou prostřednictvím  $\beta$ -kateninu [71], [72]. V mTOR signální dráze se vyskytuje několik komponent modulujících buněčný růst na základě množství aminokyselin. Při dostatku a nadbytku dochází vlivem aktivity V-ATPasy k rozkladu aminokyselin v lysosomech a následnému růstu buněk, v opačném případě buňka hladoví a aktivita V-ATPasy je potlačena. V nádorech může být abnormální růst podpořen právě prostřednictvím této dráhy a nadměrné aktivity V-ATPasy [73], [74].



Obr. 10: Schématické zobrazení vybraných signálních drah závislých na aktivitě vakuolární  $H^+$ -ATPasy (V-ATPasy). V-ATPasa (oranžová) okyseluje lumen organel a tím reguluje Notch a Wnt signalizaci, jejichž funkce je závislá na endolysosomálním systému. U Notch signalizace (růžová) dochází ke štěpení Notch intracelulární domény po navázání ligandu (světle růžová) na receptor (tmavě růžová), štěpená část vstupuje do jádra a řídí transkripci Notch cílových genů. Štěpení Notch receptoru je zvýšeno jeho internalizací do raných endosomů (zabudováním do membrány), které jsou acidifikované V-ATPasou. Signalizační dráha Wnt (žlutá) zahrnuje mnoho interakcí od vazby ligandu na receptor (světle žlutá) přes interakci PRR s V-ATPasou. Cílem je aktivace  $\beta$ -kateninu (žlutý ovál), který je přemístěn do jádra a aktivuje transkripci cílových genů. Signální molekuly obou zmíněných drah jsou degradovány v lysosomech acidifikovaných V-ATPasou. Převzato a upraveno z [66].

Změny pH v mikroprostředí tumoru mohou mít také vliv na citlivost nádoru k léčbě a následnému vzniku mnohočetné lékové rezistence [75]. U některých typů nádorů je pozorována již výše zmíněná lysosomální sekvestrace léků (viz kapitola 1.4 Rezistence, str. 28), kdy je acidifikací lysosomů V-ATPasou podpořena akumulace léčiv v lysosomech. Jiné typy nádorů využívající aktivitu V-ATPasy lokalizované na plasmatické membráně vykazují po inhibici V-ATPasy změny pH cytosolu vedoucí k buněčné smrti, ale také zvýšený příjem podávaných léčiv. Oba zmíněné příklady tvoří z V-ATPasy efektivní cíl léčby nádorů [76], [77].

### 1.5.3 Regulace vakuolární H<sup>+</sup>-ATPasy

Buněčné kompartmenty se liší hodnotami vnitřního pH (nejkyslejší prostředí mají lysosomy, dále pozdní endosomy, rané endosomy, nejméně kyselé jsou vezikuly pocházející z Golgiho aparátu). Také při některých fyziologických procesech potřebují buňky změnit translokaci protonů přes plasmatickou membránu bez zvýšené acidifikace buněčných kompartmentů (např. udržení pH moči). K tomuto účelu dokáže V-ATPasa několika mechanismy *in vivo* regulovat svou aktivitu a tím umožnit výše zmíněné rozdíly v pH [78]–[80].

Jeden možný mechanismus, kterým je aktivita V-ATPasy kontrolována, je založen na reverzibilní tvorbě disulfidické vazby mezi dvěma cysteiny v katalytickém místě V<sub>1</sub>A podjednotky (Obr. 11A, str. 37). Pokud se vazba mezi dvěma vysoce konzervovanými cysteiny vytvoří, aktivita V-ATPasy je reverzibilně potlačena. Dále je touto vazbou katalytické místo upravené do uzavřené konformace, která znemožňuje uvolnění produktu hydrolytického štěpení a navázání další molekuly ATP. K narušení disulfidické vazby a obnovení aktivity V-ATPasy dochází díky thiodisulfidové výměně zapojující další cystein V<sub>1</sub>A podjednotky [81], [82].

Druhý mechanismus regulace aktivity V-ATPasy zahrnuje úpravu hustoty výskytu protonové pumpy na membráně (Obr. 11B, str. 37). To je využito v protonovém transportu přes plasmatickou membránu v epitelových buňkách. Například protonový transport přes apikální membránu buněk distálního tubulu je řízen reverzibilní fúzí s apikální membránou buněčných kompartmentů hustě obsazených V-ATPasou [80].

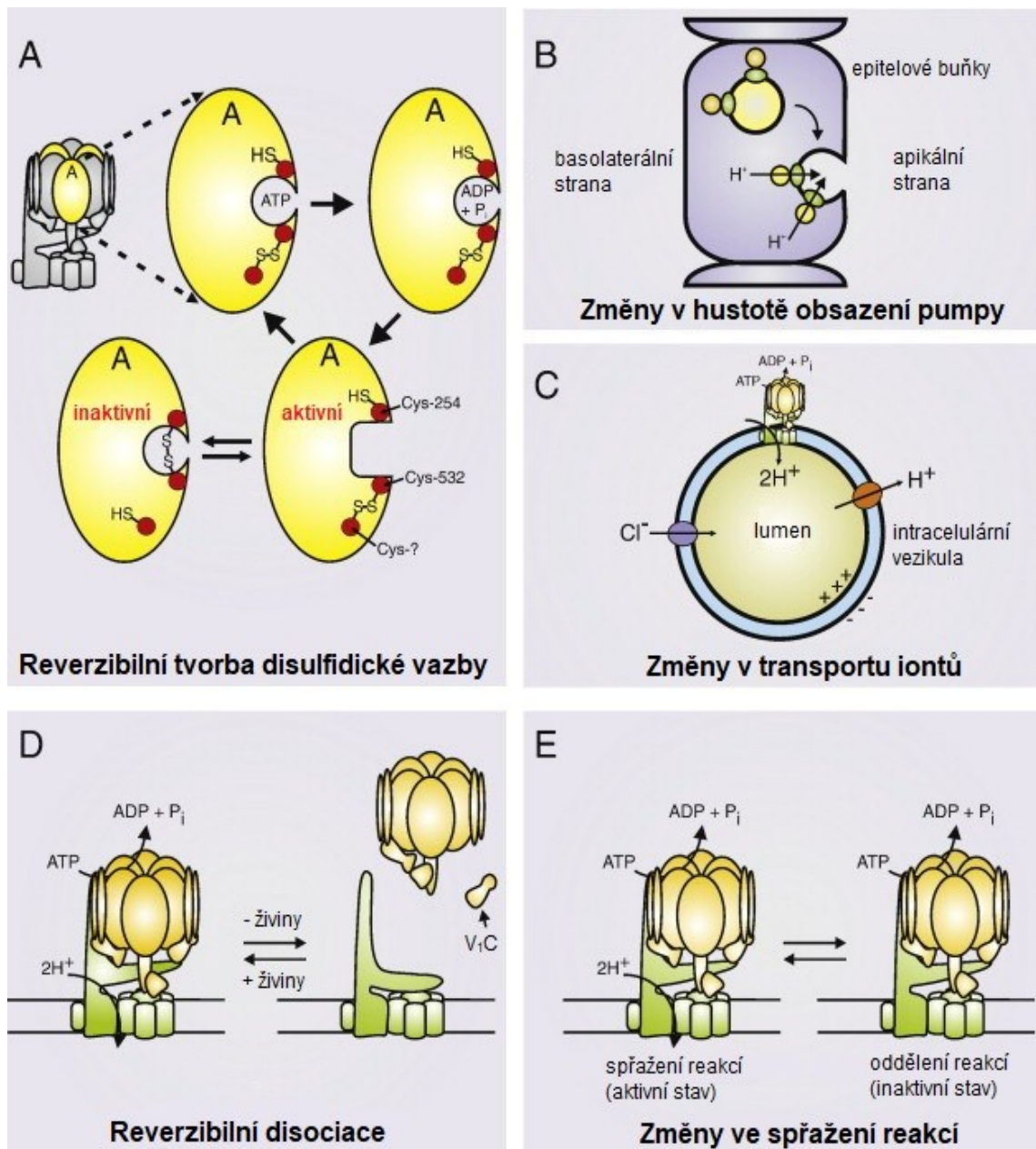
Třetí mechanismus regulace aktivity je specifický pro V-ATPasu, jedná se o reverzibilní disociaci V<sub>1</sub> a V<sub>0</sub> domén (Obr. 11D, str. 37), čímž je přerušena jejich

aktivita. V kvasinkách je reverzibilní disociace řízena faktory prostředí jako dostupnost živin nebo extracelulární pH, u vyšších živočichů je disociace či zpětné složení komplexu řízeno nejen živinami, ale i hormony a růstovými faktory [83]–[87]. Ze studií na kvasinkách a hmyzu bylo zjištěno několik informací o mechanismu disociace – na počátku rozdělování komplexu dochází k uvolnění  $V_1C$  podjednotky do cytoplasmu buňky, která je až do opětovného složení samostatná; dále bylo zjištěno, že k rozdělení domén bez vnějšího zásahu dochází při vysokoenergetické konformaci katalytického hexameru, tedy v přítomnosti nehydrolyzovaného či neupraveného ATP [83], [88]. Významný vliv na regulaci hydrolytické aktivity má také  $V_1H$  podjednotka. Krystalografické snímky disociované  $V_1$  domény odhalily konformační změny C-konce této podjednotky, který se váže na hexamer  $A_3B_3$  a tím zcela inhibuje rotorovou aktivitu. Delecí  $V_1H$  podjednotky byla zjištěna ATPasová aktivita  $V_1$  domény, také stále zůstává schopnost znovusložení V-ATPasy, tento složený komplex (bez H podjednotky) však postrádá ATPasovou aktivitu i schopnost translokace protonů. Vyšší živočichové (včetně lidí) ale postrádají C-koncovou část H podjednotky zodpovědnou za popsanou inhibici. Není tedy známo, zda se H podjednotka do inhibice zapojuje odlišným mechanismem nebo má na autoinhibici domény  $V_1$  podíl pouze vychytávání ADP [48], [89]. Volná  $V_0$  doména, ač zůstává zabudovaná v membráně, ztrácí disociací periferní domény svou proton-transportní aktivitu. Elektronová mikroskopie ukázala, že i na  $V_0$  doméně se po disociaci objevují nové interakce. První je mezi N-koncem podjednotky  $V_0a$  a podjednotkou  $V_0d$ , u které některé experimenty naznačovaly zablokování protonového transportu propojením rotoru a statoru komplexu, další studie však ukázaly, že delecí  $V_0a$  nebo  $V_0d$  podjednotky se inhibovaný transport protonů neobnoví. Druhá nově popsaná interakce je mezi C-koncem  $V_0a$  podjednotky a proteolipidickým c-kruhem – toto propojení již bylo prokázáno jako autoinhibiční proces aktivity  $V_0$  domény [90]. Rozpojené domény jsou konvertovány do určitých konformací, díky kterým jsou stabilizované. Pro znovusložení komplexu je důležitá změna do konformace, která složení umožňuje. U kvasinek byla navíc zjištěna přítomnost „regulátoru  $H^+$ -ATPas vakuolárních a endosomálních membrán“ (RAVE), chaperonového komplexu, který podporuje spojení domén  $V_1$ ,  $V_0$  a podjednotky  $V_1C$  do uceleného komplexu. Kromě RAVE je pro správné složení V-ATPasy nutná přítomnost i několika enzymů, například aldolasy a 1-fosfofruktokinasy. Přesný mechanismus zapojení těchto molekul však není známý [57], [91]–[93].

Čtvrtý mechanismus řídící aktivitu V-ATPasy se týká změn v propojení hydrolysy ATP a protonového transportu (*Obr. 11E*, str. 37). Vliv na tyto změny mohou mít různé faktory – omezená proteolýsa, zvýšená koncentrace ATP, mutace některých podjednotek V-ATPasy (např. V<sub>1</sub>D a V<sub>1</sub>A) i jednotlivé isoformy podjednotek, které jsou dále důležité k cílení V-ATPas do vybraných organel a regulaci znovusložení disociované V-ATPasy [53], [94]–[96].

Poslední mechanismus regulace acidifikace *in vivo* a zároveň ovlivnění aktivity V-ATPasy spočívá ve změnách aktivity ostatních membránových transportérů (*Obr. 11C*, str. 37). V-ATPasa je elektrogenní pumpa, která vytváří pozitivní potenciál, tento však bývá alespoň zčásti kompenzován transportem částic s opačným nábojem (primárně chloridovým kanálem). Finální pH buněk a organel však závisí na kombinaci aktivního i pasivního transportu částic [53].

Vakuolární ATPasa je svou funkcí i regulací v mnohých fyziologických procesech pro organismus důležitá, může být však zneužita i ve prospěch procesů patologických. Vzhledem k členité struktuře existuje mnoho možností, jak se aktivita tohoto komplexu může měnit se podmínkám v organismu přizpůsobovat. Zkoumáním, zda je pro různé procesy důležitá přítomnost a aktivita vybraných podjednotek komplexu nebo určité protein-proteinové interakce mezi jednotlivými podjednotkami, se V-ATPasa může stát novým terapeutickým cílem nejen pro snížení chemorezistence nádorů, ale i pro několik dalších poruch [51], [53], [59]–[61], [76], [77].



Obr. 11: Mechanismy regulace V-ATPasy. A – vznik reverzibilní disulfidické vazby mezi dvěma cysteiny v podjednotce V<sub>1</sub>A uzavírající katalytické místo a tím znemožňující jeho funkci. B – změny v hustotě obsazení protonové pumpy na membráně fúzí s membránami vezikul bohatých na V-ATPasu. C – změna v aktivitě jiných transportérů a přenosu iontů přes membránu. D – reverzibilní disociace komplexu na samostatné a inaktivní V<sub>1</sub> a V<sub>0</sub> domény způsobená vnějšími vlivy. E – změny ve spřažení funkcí domén V-ATPasy. Převzato a upraveno z [53].

## 2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo sledovat vybrané podjednotky enzymového komplexu vakuolární ATPasy (V-ATPasy) a jejich vliv na vznik rezistence k ellipticinu v lidských neuroblastomových buňkách porovnáváním senzitivní buněčné linie UKF-NB-4 a rezistentní linie vůči ellipticinu UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>. Jedním z mechanismů rezistence vůči ellipticinu je i sekvestrace v lysosomech, při které hraje V-ATPasa významnou roli. Pro dosažení cíle byly provedeny následující kroky:

- kultivace lidských neuroblastomových buněčných linií senzitivních (UKF-NB-4) a rezistentních k ellipticinu (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>);
- stanovení relativní exprese podjednotky ATP6V0D1 v obou buněčných liniích před a po jejich ovlivněním ellipticinem metodou kvantitativní RT-PCR;
- umlčení vybraných genů V-ATPasy transfekcí buněk příslušnými siRNA a ověření úspěšnosti transfekce buněk stanovením exprese vybraných částí V-ATPasy metodou Western blot a kvantitativní RT-PCR;
- subcelulární lokalizace ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v přirozeném stavu buněk a po jejich transfekci vybranými siRNA;
- stanovení proliferace a viability buněk neuroblastomových linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> po transfekci siRNA a po přidání ellipticinu.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Použité chemikálie

Abcam (USA): primární protilátka proti ATP6V0D1; primární protilátka proti aktinu

BIO-RAD (USA): „DC Protein Assay“ set ke stanovení koncentrace izolovaných proteinů obsahující: Reagent A, Reagent S, Reagent B; „Blotting Grade Non Fat Dry Milk“ sušené mléko; „Mini-PROTEAN TGX“ předpřipravený polyakrylamidový gel; nitrocelulosaová membrána s póry o velikosti 0,45 µm; „Precision Plus Protein Dual Color Standards“ standard molekulových hmotností; sekundární protilátka proti myšimu imunoglobulinu

Carl Roth (Německo): merkaptoethanol

Dharmacon (USA): „DharmaFECT“ transfekční činidlo; „ON-TARGET plus siRNA“

Fluka (Německo): Igepal CA 630; Ponceau S

Generi Biotech (ČR): „gb Easy PCR Master Mix“ činidlo pro RT-PCR obsahující: hot-start Taq DNA polymerasu, reakční pufr, dNTP, MgCl<sub>2</sub> a aditiva zabraňující inhibici PCR reakce; „gb Reverse Transcription Kit“ kit pro reverzní transkripci obsahující: pufr, dNTP, primery, enzym reverzní transkriptasu; primery a sondy: Assay qPCR hPOLR2A FAM, Assay qPCR hATP6V0D1 FAM;

Gibco (USA): „Iscove's modified Dulbecco's“ médium (IMDM) s glutaminem; sodno-fosfátový pufr s obsahem NaCl (PBS); hovězí sérum (fetal bovine serum, FBS); trypsin

Invitrogen (USA): dodecylsulfát sodný (SDS); „LysoTracker Red“ barvivo pro značení lysosomů a jiných organel s nízkým pH

Penta (ČR): bromfenolová modř; methylalkohol

Roche (Německo): „Complete protease inhibitor“ proteasový inhibitor

Sigma-Aldrich (USA): bafilomycin A; deoxycholát sodný; ellipticin; glycerol; polyoxyethylensorbitanmonolaurát (TWEEN 20); Tris pufr;

2'-(4-ethoxyfenyl)-5-(4-methyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid trihydrat (Hoechst 33342)

Thermo Fisher Scientific (USA): „PrestoBlue“ resazurinové barvivo; „PureLink™ RNA Mini Kit“ kit pro izolaci RNA obsahující: „Lysis Buffer“ (guanidin-isothiokyanátový pufr), „Wash Buffer I“ (obsahující guanidin-isothiokyanát), „Wash Buffer II“ (nutno doplnit 100% ethanolem dle návodu), „RNase-Free Water“, „Spin cartridges with collection tubes“, „Collection Tubes“, „Recovery Tubes“;

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. (pro analýzu) nebo vyšší čistoty.

Neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-4 byla poskytnuta prof. J. Cinatlem z JW Goethe-Universität, Frankfurt nad Mohanem. Příprava této linie proběhla na dětské onkologii Fakultní nemocnice ve Frankfurtu n. M. z kostní dřeně infiltrované nádorovými buňkami při recidivě neuroblastomu vysokého rizika s amplifikací *MYCN*. Od linie UKF-NB-4 byla v laboratoři Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole dlouhodobou kultivací se vzrůstající koncentrací ellipticinu odvozena rezistentní linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> [97].

## 3.2 Použité přístroje

Applied Biosystems (USA): QuantStudio 3 Real-Time PCR System – přístroj pro RT-PCR;

Agilent (USA): xCELLigence RTCA DP – přístroj pro sledování růstu, invazivity a migrace buněk v reálném čase

BioAir (Itálie): AURA PCR – box;

BIO-RAD (USA): Mini-PROTEAN Tetra Cell – aparatura pro vertikální elektroforézu; TC 20 – počítadlo buněk;

Eppendorf (Německo): Centrifuge 5415 R – stolní centrifuga;

Hettich (Německo): UNIVERSAL 320 – stolní centrifuga;

Labnet (USA): Gyro Twiester – laboratorní třepačka; Labroller II – rotátor;

Leica microsystems (Německo): Leica DMI8 – konfokální mikroskop

Merck (Německo): SNAP i.d. 2.0 – vakuová aparatura pro promývání membrán po Western blotu

Molecular Devices (USA): SpectraMax i3x – destičkový reader měřící absorbanci, fluorescenci a luminiscenci; VersaMax Microplate Reader – spektrofotometr;

SensoQuest (Německo): Labcycler – termocykler;

Schoeller (ČR): Clean Air – laminární box;

Techne (UK): Dri-block heater – výhřevný blok;

Thermo Scientific (USA): HeraCell Vios 160i – inkubátor; Nanodrop 1000 – spektrofotometr;

VELP SCIENTIFICA (Itálie): Vortex Rw<sup>3</sup> – vortex;

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Rozmrazení buněk

Hluboko zmražené suspenze neuroblastomových buněčných linií senzitivních (UKF-NB4) a rezistentních vůči ellipticinu (UKF-NB4<sup>ELLI</sup>) v kompletním médiu (IMDM médium + 10% fetální hovězí sérum (FBS)) s 10% dimethylsulfoxidem (DMSO) uchovávané v tekutém dusíku o teplotě -196 °C byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Buněčné suspenze byly následně ve sterilních podmínkách přeneseny do zkumavek s 5 ml kompletního média o laboratorní teplotě a centrifugovány při laboratorní teplotě 3 minuty při 300× g ve stolní centrifuze Hettich UNIVERSAL 320 (Německo). Supernatanty byly odstraněny, buněčné pelety byly resuspendovány v 5 ml kompletního média o pokojové teplotě a suspenze byly následně přeneseny do sterilních kultivačních lahví pro adherentní buňky o kultivační ploše 25 cm<sup>2</sup>. Buňky byly kultivovány v inkubátoru Thermo Scientific HeraCell Vios 160i (USA) při teplotě 37 °C, 5% oxidem uhličitým a 95% vlhkostí vzduchu.

### 3.3.2 Kultivace neuroblastomových buněčných linií

Neuroblastomové buněčné linie senzitivní (UKF-NB4) a rezistentní vůči ellipticinu (UKF-NB4<sup>ELLI</sup>) byly kultivovány v IMDM médiu s přidavkem 10% fetálního hovězího séra (FBS) (kompletní médium) ve sterilních kultivačních lahvích s adherentním povrchem o kultivační ploše 75 cm<sup>2</sup>. Buňky ke kultivaci byly uloženy v inkubátoru Thermo Scientific HeraCell Vios 160i (USA) s prostředím 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> a 95% vlhkostí. Buněčné linie mají zdvojovací čas přibližně 20 hodin (Hraběta J., nepublikované výsledky), proto byly pasážovány pravidelně 2x – 3x týdně. Před pasáží byly nejprve roztoky kompletního média a 0,05% trypsinu v PBS vytemperovány ve vodní lázni na 37 °C. Pasážování buněk probíhalo za sterilních podmínek v laminárním boxu Schoeller Clean Air (ČR). Buňky byly promyty roztokem PBS, následně 0,05% roztokem trypsinu v PBS a uloženy na 5 minut do inkubátoru. Po jejich uvolnění z adherentního povrchu kultivační lahve byly buňky resuspendovány 5 ml kompletního média. Buněčná suspenze byla dostatečně naředěna a kultivována dle již popsaného postupu na začátku odstavce.

### **3.3.3 Příprava vzorků buněčných extraktů pro analýzu pomocí kvantitativní reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) a metody Western blot**

Buňky v suspenzi vzniklé po trypsinaci (viz kapitola 3.3.2) byly spočítány na počítadle buněk BIO-RAD TC 20 (USA) a následně přeneseny do Petriho misek o kultivační ploše 22,1 cm<sup>2</sup> tak, aby v celkovém objemu 4 ml bylo  $4,8 \cdot 10^5$  buněk. Misky byly uloženy do inkubátoru Thermo Scientific HeraCell Vios 160i (USA) při teplotě 37 °C, 5% oxidu uhličitém a 95% vlhkosti. Vzorkům buněk určených pouze pro analýzu s cytostatikem (ellipticinem) bylo po 24 hodinách vyměněno médium bez cytostatika (kontrolní vzorek pro obě linie) nebo médium s přidavkem 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrace ellipticinu a buňky byly opět inkubovány 24 hodin v inkubátoru za stejných podmínek. Vzorky buněk určených pro transfekci příslušnou siRNA a následné přidání ellipticinu byly po 24 hodinách transfekovány (viz kapitola 3.3.4), následně uloženy na 48 hodin do inkubátoru za stejných podmínek, poté jim bylo vyměněno médium bez cytostatik (kontrolní vzorky obou linií) nebo médium s 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrací ellipticinu a opět 24 hodin inkubovány v inkubátoru za stejných podmínek. Oba zmíněné typy vzorků buněk byly následně pomocí pipety uvolněny z kultivačního povrchu Petriho misky, vzniklé suspenze byly přeneseny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány 3 minuty při 300× g ve stolní centrifuze Hettich UNIVERSAL 320 (Německo) při laboratorní teplotě. Poté byly supernatanty odstraněny, pelety promyty 1 ml roztoku PBS a vzorky opět centrifugovány za stejných podmínek. Vzniklé supernatanty byly odstraněny, pelety resuspendovány v 700  $\mu\text{l}$  roztoku PBS, suspenze přeneseny do mikrozkušavek a centrifugovány za stejných podmínek. Supernatanty byly odstraněny a pelety byly uloženy na nejméně 30 minut do -80 °C.

### **3.3.4 Transfekce buněk molekulami siRNA**

Připravené vzorky neuroblastomových buněčných linií v kultivačních miskách nebo destičkách byly po 24-hodinové inkubaci transfekovány roztoky siRNA. DharmaFECT 10  $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  siNC, siATP6V0D1 nebo siATP6V1H1 (Dharmacon ON-TARGETplus) byly za sterilních podmínek naředěny IMDM médiem v poměru 1 : 49 a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. K roztokům siRNA byl následně přidán v poměru 1 : 1 připravený roztok DharmaFECTu a směsi byly inkubovány 20 minut při laboratorní

teplotě. Poté bylo do obou roztoků siRNA přidáno v poměru 1 : 4 kompletní médium (IMDM médium + 10% FBS) o laboratorní teplotě. Připraveným vzorkům buněk v kultivačních miskách nebo destičkách bylo odebráno médium, následně byl přidán příslušný objem připraveného roztoku siRNA v IMDM médiu a vzorky byly inkubovány 48 hodin v inkubátoru Thermo Scientific HeraCell Vios 160i (USA) při teplotě 37 °C, 5% oxidu uhličitém a 95% vlhkosti vzduchu.

### **3.3.5 Izolace RNA ze vzorků neuroblastomových buněčných linií pro reverzní transkripci a kvantitativní polymerásovou reakci v reálném čase (RT-PCR)**

Izolace RNA ze vzorků buněk připravených dle kapitoly 3.3.2 byla provedena využitím kitu „PureLink RNA Mini Kit“ postupem podle návodu výrobce za sterilních podmínek v boxu BioAir AURA PCR (ČR). K buněčným peletám v mikrozkuvkách bylo přidáno 0,6 ml „Lysis Buffer“ s 1% merkaptoethanolem. Pelety byly resuspendovány pomocí vortexu VELP SCIENTIFICA Rw<sup>3</sup> (Itálie). Následně byl k suspenzím přidán 70% ethanol v poměru 1 : 1 a vzorky byly opět homogenizovány na vortexu. Homogenizáty byly převedeny do „spin cartridge“ nasazených na „collection tube“ a centrifugovány 15 sekund při laboratorní teplotě a 12000× g ve stolní centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415 R (Německo). Přefiltrovaný objem vzorků byl odstraněn, zachycená RNA na „spin cartridge“ byla promyta 700 µl „Wash Buffer I“ a vzorky byly centrifugovány za stejných podmínek. „Spin cartridge“ byly vloženy do nových „collection tube“, promyty 500 µl „Wash Buffer II“ a centrifugovány za stejných podmínek. Tento krok byl opakován. Na závěr byly vzorky centrifugovány 2 minuty při laboratorní teplotě a 12000× g tak, aby byla membrána „spin cartridge“ vysušena. Poté byly „spin cartridge“ vloženy do „recovery tube“ a doprostřed membrány bylo pipetováno 60 µl „RNase-free water“. Vzorky byly inkubovány 1 minutu při laboratorní teplotě a na závěr centrifugovány 2 minuty při laboratorní teplotě a 12000× g, čímž bylo dosaženo přenosu izolované RNA z membrány do roztoku. Koncentrace izolované RNA byla zjištěna na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 1000 (USA).

### **3.3.6 Reverzní transkripce**

Vzorky izolované RNA získané dle kapitoly 3.3.5 byly připraveny přidáním deionizované vody tak, aby bylo v roztoku 1000 ng RNA. Za sterilních podmínek v boxu BioAir

AURA PCR (ČR) bylo do mikrozkušavek pipetováno 10 µl roztoku „Master Mix“ z kitu gb Reverse Trascription Kit a 10 µl naředěného roztoku izolované RNA. Vzorky byly vloženy do termocykleru SensoQuest Labcycler (Německo) a zahřívány na 42 °C po dobu 60 minut, poté zchlazeny a udržovány při 4 °C.

### **3.3.7 Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (Real-time PCR, RT-PCR) genu V-ATPasy *ATP6V0D1***

Kvantitativní polymerasová řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) je metoda založena na klasické polymerasové reakci, množství syntetizované DNA je však kontinuálně zaznamenáváno v průběhu každého cyklu. K detekci množství DNA je využito fluorescenčních značek, a to buď navázaných na substrátu a detekovatelných až po jeho zapojení do molekuly DNA (SyberGreen), nebo navázaných na molekulách sondy a detekovatelných po odštěpení od molekuly zhášeče, ke kterému dochází během syntézy DNA (TaqMan sondy). V této práci byla využita metoda s TaqMan sondou.

Vzorky pro RT-PCR byly připravovány v tripletech do 96-jamkové destičky. Nejprve byly za sterilních podmínek v boxu BioAir AURA PCR (ČR) do zkumavek připraveny roztoky primerů Thermo Fisher Scientific (USA) hATP6V0D1 a hPOLR2A s FAM značenými sondami (6-Carboxyfluorescein) – do 10 µl „Universal PCR Master Mix“ bylo pipetováno 7 µl „RNase-free“ vody a 2 µl roztoku primerů a sondy. Do mikrodestičky byl následně pipetován 1 µl cDNA syntetizované dle kapitoly 3.3.6 a poté 19 µl připravené směsi primerů a „Universal Master Mixu“. Vzorky byly na závěr vloženy do přístroje Applied Biosystems QuantStudio 3 Real-Time PCR System (USA) a zpracovávány za následujících podmínek:

3 minuty: 95 °C

50x opakování cyklu – 10 sekund: 95 °C; 20 sekund: 60 °C

∞: 4 °C

Experimenty vedoucí až ke kvantitativní polymerasové řetězové reakci v reálném čase byly provedeny v nejméně třech nezávislých opakováních. Pro analýzu naměřených hodnot bylo využito relativní kvantifikace, tedy relativní změny exprese genu vůči vnitřní kontrole (gen *POLR2A*), v softwaru REST-384-beta version [98]. Tento program byl též využit ke statistickému vyhodnocení získaných výsledků (viz kapitola 3.3.15 Statistické

zpracování dat). Relativní exprese genu ( $R$ ) je v tomto softwaru vypočítávána na základě individuální RT-PCR účinnosti cílového genového transkriptu ( $E_{cíl.genu}$ ) a hodnotě cyklu prahu (cycle of treshold) ( $\Delta CP_{cíl.genu}$ ) v poměru s těmito veličinami pro gen vnitřní kontroly ( $E_{kontr}$ ,  $\Delta CP_{kontr}$ ), konkrétně:

$$R = \frac{(E_{kontr})^{\Delta CP_{kontr}}}{(E_{cíl.genu})^{\Delta CP_{cíl.genu}}}$$

### **3.3.8 Izolace proteinů ze vzorků neuroblastomových buněčných linií pro analýzu metodou Western blot**

Buněčné pelety neuroblastomových linií připravené podle kapitoly 3.3.3 byly resuspendovány roztokem pufru RIPA (1% Igepal CA 630 (detergent), 0,5% deoxycholát sodný a 0,1% SDS v PBS) s proteasovým inhibitorem „Complete protease inhibitor“ smísených v poměru 1 : 24, a to 1-2x objemem buněčné pelety. Buněčné suspenze byly následně 60 minut inkubovány na ledu a poté centrifugovány ve vychlazené stolní centrifuze Hettich UNIVERSAL 320 (Německo) po dobu 20 minut při 4 °C a 20000× g. Supernatanty s buněčnými proteiny byly přeneseny do mikrozkušavek a uchovány pro další postup v -80 °C.

### **3.3.9 Stanovení koncentrace izolovaných proteinů dle Lowryho**

Koncentrace proteinů izolovaných z buněčných lyzátů dle kapitoly 3.3.8 byly stanoveny metodou podle Lowryho. Vzorky byly nejprve 8x ředěny deionizovanou vodou. Následně bylo do titrační destičky pipetováno 5 µl vzorku – nejprve duplikát ředící řady sérového hovězího albuminu (BSA) jako standardu o koncentracích 0 (deionizovaná voda); 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 2,0 a 2,8 mg/ml a dále triplikáty 8x ředěných vzorků. Poté bylo do všech jamek přidáno 25 µl roztoku A' (roztok S a roztok A v poměru 1 : 50) a 200 µl roztoku B. Vzorky v titrační destičce byly 15 minut inkubovány za pomalého míchání při laboratorní teplotě na laboratorní třepače Labnet Gyro Twiester (USA). Na závěr byly vzorky analyzovány spektrofotometrem Molecular Devices VersaMax Microplate Reader (USA) při vlnové délce 750 nm a vyhodnoceny programem SoftMax Pro, kde byly identifikovány koncentrace proteinů ve vzorcích.

### **3.3.10 Separace izolovaných proteinů elektroforézou na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)**

Izolované proteiny z neuroblastomových buněčných linií získaných dle kapitoly 3.3.8 byly separovány elektroforeticky v komerčním předpřipraveném polyakrylamidovém gelu Mini-PROTEAN TGX umístěném v elektroforetické aparatuře BIO-RAD (USA) se 770 ml „Running buffer“ (roztok 25mM pufru Tris, 192 mM glycinu a 0,1% SDS doplněný deionizovanou vodou v poměru 1 : 10). Vzorky proteinů byly nejprve naředěny tak, aby jejich nanáška odpovídala 40 µg na jamku a poté k nim byl přidán vzorkový pufr (375 mM Tris-HCl pH 6,8; 9% SDS; 50% glycerol; 9% merkaptoethanol a 0,03% bromfenolová modř) v poměru 1 : 3 (vzorkový pufr : vzorek proteinů). Vzorky byly následně inkubovány 5 minut při teplotě ~100 °C ve výhřevném bloku Techne Dri-block heater (UK) a zchlazeny na ledu. Do gelu připraveného v elektroforetické aparatuře (vertikálním uspořádání) byl nejprve naneseny 4 µl standardu molekulových hmotností „Precision Plus Protein Dual Color Standards“ a následně jednotlivé vzorky. Separace proteinu probíhala při konstantním proudu 40 mA přibližně 30 minut.

### **3.3.11 Analýza proteinů ze vzorků neuroblastomových buněčných linií metodou Western blot**

Přenos separovaných proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu metodou Western blot byl uskutečněn v aparatuře BIO-RAD (USA). Nejprve byl připraven „Blotting buffer“ (roztok 25 mM Tris a 192 mM glycinu doplněný methanolem a deionizovanou vodou v poměru 1 : 2 : 7), do kterého byla namočená nitrocelulosová membrána, filtrační papíry a „fiber“. Poté byla sestavena aparatura k přenosu proteinů postupným seskládáním „fiberu“, filtračního papíru, polyakrylamidového gelu se separovanými proteiny, nitrocelulosové membrány, filtračního papíru a „fibru“, která byla na závěr ponořena do „Blotting buffer“. Přenos probíhal při teplotě 4 °C, konstantním proudu 350 mA po dobu 80 minut. Správnost přenosu byla ověřena obarvením membrány v roztoku Ponceau S, poté byla membrána odbarvena roztokem PBS a 1 hodinu blokována v 5% roztoku mléka v pufru PBS/Tween (1 ml 20% Tween ve 400 ml PBS) za mírného míchání na laboratorní třepačce Labnet Gyro Twiester (USA). Následně byla membrána přenesena do falkony s připravenou

primární protilátkou proti ATP6V0D1 v 5% roztoku mléka v PBS/Tween (v poměru 1 : 500) a inkubována za stálého míchání na rotátoru Labnet Labroller II (USA) přes noc při 4 °C. Druhý den byla membrána promyta ve vakuové aparatuře Merck SNAP i.d. 2.0 (Německo) pufrům PBS/Tween, poté byla inkubována 20 minut při laboratorní teplotě s roztokem sekundární protilátky (proti myšímú imunoglobulinu, ředěna 5% mlékem v PBS/Tween a pufrům PBS/Tween v poměru 1 : 100 : 5000) a opět promyta pufrům PBS/Tween. Membrána byla přenesena do folie, vložena do kazety a analyzována v přístroji SpectraMax i3x Reader (USA). Následně byla membrána ponořena na 8 minut do misky s odmývacím roztokem, promyta pufrům PBS, blokována 1 hodinu v roztoku 5% mléka v pufru PBS/Tween a následně inkubována s primární protilátkou proti aktinu na rotátoru Labnet Labroller II (USA) asi 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté bylo postupováno dle již popsaných kroků.

Experimenty vedoucí až k analýze proteinů ze vzorků metodou Western blot byly provedeny v nejméně třech nezávislých měřeních, jednotlivé snímky membrán byly vyhodnoceny kvantifikací v programu ImageJ.

### **3.3.12 Lokalizace ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích a pozorování změn po jejich transfekci siRNA konfokálním mikroskopem**

Neuroblastomové buněčné linie kultivované podle kapitoly 3.3.2 byly počítány na počítadle buněk BIO-RAD TC 20 (USA) a následně přeneseny do dvou-mililitrových misek se čtyřmi komůrkami pro konfokální mikroskopii (35 mm Dish with 10 mm Bottom Well) tak, aby bylo v 0,5 ml kompletního média (IMDM médium + 10% FBS)  $4,5 \cdot 10^4$  buněk. Misky byly na 24 hodin uloženy do inkubátoru Thermo Scientific HeraCell Vios 160i (USA) při teplotě 37 °C, 5% oxidu uhličitém a 95% vlhkosti. Poté byly buňky transfekovány příslušnou siRNA (kapitola 3.3.4) (kontrolním liniím bylo pouze vyměněno médium) a inkubovány 48 hodin za stejných podmínek. Podle požadovaného experimentu byly následně buňky 30 minut inkubovány při 37 °C, 5% oxidu uhličitém a 95% vlhkosti s  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ellipticinem, případně k nim bylo poté přidáno barvivo (dle experimentu):  $25 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  LysoTracker Red a  $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  2'-(4-ethoxyfenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid trihydrat (Hoechst 33342). Buňky byly opět 30 minut inkubovány a poté pozorovány konfokálním mikroskopem Leica DMi8 (Německo) a analyzovány programem Leica

Application Suite X. Závěry z popsaného experimentu byly vyvozeny z nejméně tří na sobě nezávislých pozorování.

### **3.3.13 Stanovení proliferace buněk v reálném čase technologií xCELLigence RTCA DP**

Neuroblastomové buněčné linie kultivované dle kapitoly 3.3.2 byly spočítány na počítadle buněk BIO-RAD TC 20 (USA) a přeneseny do Petriho misek s kultivační plochou 9,2 cm<sup>2</sup> tak, aby jejich počet v celkovém objemu 2 ml byl  $2 \cdot 10^5$ . Misky byly přeneseny do inkubátoru Thermo Scientific HeraCell Vios 160i (USA) a byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C, 5% oxidu uhličitém a 95% vlhkosti. Poté byly buňky transfekovány siNC nebo siATP6V0D1 dle kapitoly 3.3.4. a inkubovány za stejných podmínek 24 hodin. Proliferace buněk byla stanovena pomocí přístroje Agilent Technologies xCELLigence RTCA DP (USA) v 16-jamkových destičkách (RTCA E-Plate Inserts 16), který umožňuje neinvazivní monitorování buněčné proliferace v reálném čase na základě měření impedance, která koreluje s adhezí živých buněk bez nutnosti jejich značení. Do destiček bylo nejprve pipetováno 50 µl kompletního média (IMDM médium + 10% FBS) nebo kompletního média s 5 µmol·dm<sup>-3</sup> ellipticinem, destičky byly vloženy do přístroje xCELLigence RTCA DP umístěného v inkubátoru Thermo Scientific HeraCell Vios 160i (USA) s nastavenými podmínkami 37 °C, 5% oxidem uhličitým a 95% vlhkostí a byla spuštěna kalibrace. Poté bylo do destiček pipetováno 100 µl buněčné suspenze tak, aby bylo v každé jamce  $1 \cdot 10^4$  buněk a destičky byly vloženy zpět do přístroje. Poté bylo spuštěno snímání buněk po dobu 88 hodin v 15–30-minutových intervalech a jednotlivé hodnoty byly zaznamenávány a analyzovány v pomoci xCELLigence RTCA softwaru.

Experiment byl proveden ve dvou nezávislých měřeních (biologický duplikát) a zpracování získaných výsledků bylo provedeno v tabulkovém softwaru Microsoft Excel výpočtem průměru naměřených hodnot a směrodatné odchylky.

### **3.3.14 Stanovení viability buněk neuroblastomových linií pomocí činidla PrestoBlue**

Viabilita neuroblastomových buněčných linií po transfekci siRNA pomocí činidla PrestoBlue byla stanovena ve 24-jamkových kultivačních destičkách, do kterých bylo pipetováno 150 µl kompletního média (IMDM médium + 10% FBS). Neuroblastomové

buněčné linie kultivované dle kapitoly 3.3.2 byly spočítány na počítadle buněk BIO-RAD TC 20 (USA) a přeneseny do 24-jamkových kultivačních destiček tak, aby bylo  $4 \cdot 10^4$  buněk v celkovém objemu jamky 350  $\mu\text{l}$ . Destičky byly kultivovány 24 hodin v inkubátoru Thermo Scientific HeraCell Vios 160i (USA) při teplotě 37 °C, 5% oxidu uhličitém a 95% vlhkosti. Poté byly buňky transfekovány siNC, siATP6V0D1 nebo siATP6V1H1 dle kapitoly 3.3.4 a inkubovány 48 hodin v inkubátoru za stejných podmínek. Ze všech jamek bylo odebráno médium, do destiček bylo pipetováno 350  $\mu\text{l}$  kompletního média nebo 350  $\mu\text{l}$  kompletního média s  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ellipticinem a destičky byly inkubovány 48 hodin v inkubátoru za stejných podmínek. Následně bylo do každé jamky přidáno 17,5  $\mu\text{l}$  barviva PrestoBlue (resazurin) a destičky byly inkubovány 30 minut v inkubátoru za stejných podmínek. Na závěr byly destičky analyzovány přístrojem SpectraMax i3x Reader (USA) měřením absorbance při vlnové délce 571 nm a vyhodnoceny softwarem SoftMax Pro.

Popsaný experiment byl proveden ve dvou nezávislých měřeních. Výsledky byly zpracovány v tabulkovém softwaru Microsoft Excel výpočtem průměru měření, směrodatné odchylky, významnost výsledků byla vyhodnocena pomocí párového t-testu (viz další kapitola).

### **3.3.15 Statistické zpracování dat**

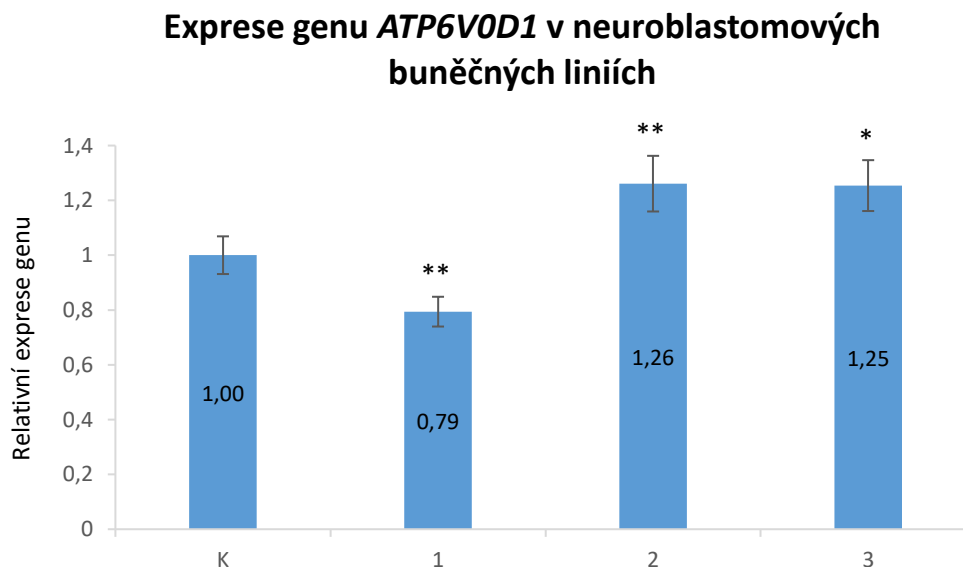
Výsledky získané pomocí metody RT-PCR byly statisticky vyhodnoceny softwarem REST-384-beta version (z angl. relative expression software tool). Tento program porovnává dvě skupiny dat (zvolený druh vzorků proti zvolené kontrole, která je pro daný experiment vždy stejná) a testuje rozdílnost skupin k určení významnosti výsledků pomocí nově vyvinutého randomizačního testu. Randomizační test opakovaně a náhodně přerozděluje a porovnává páry dat z obou zvolených skupin a pokaždé zaznamenává míru exprese. Poměr všech těchto expresí vyjadřuje signifikanci (významnost) naměřených výsledků [99]. Přesnější popis softwaru a návody jsou přístupné na odkazu [98].

Číselné výsledky z ostatních experimentů byly vyhodnocovány v tabulkovém softwaru Microsoft Excel výpočtem průměrů a směrodatných odchylek zvolených hodnot. U metody stanovení viability buněk činidlem PrestoBlue byla statistická významnost naměřených hodnot vyhodnocena párovým t-testem, který se používá k porovnání středních hodnot dvou zvolených populací. Také pro tento výpočet bylo využito matematické funkce v tabulkovém softwaru Microsoft Excel [100].

## 4 Výsledky

### 4.1 Stanovení exprese genu *ATP6V0D1* vakuolární $H^+$ -ATPasy v lidské neuroblastomové buněčné linii senzitivní (UKF-NB-4) a rezistentní k ellipticinu (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>) po jejich ovlivnění ellipticinem metodou RT-PCR

Nejprve byla stanovena exprese membránové domény V-ATPasy *ATP6V0D1*. Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> byly inkubovány 24 hodin s ellipticinem. Expresse genu *ATP6V0D1* v jednotlivých buněčných vzorcích uvedená na Obr. 12 byla vztažena ke kontrolní linii UKF-NB-4 (relativní exprese zvolena jako jedna). Ze získaných výsledků je patrné snížení exprese tohoto genu v senzitivní linii UKF-NB-4 po inkubaci s ellipticinem, naopak u linie rezistentní k léčbě ellipticinem UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> byla exprese *ATP6V0D1* genu zvýšena. Po inkubaci rezistentní linie s ellipticinem se exprese genu výrazněji neměnila.

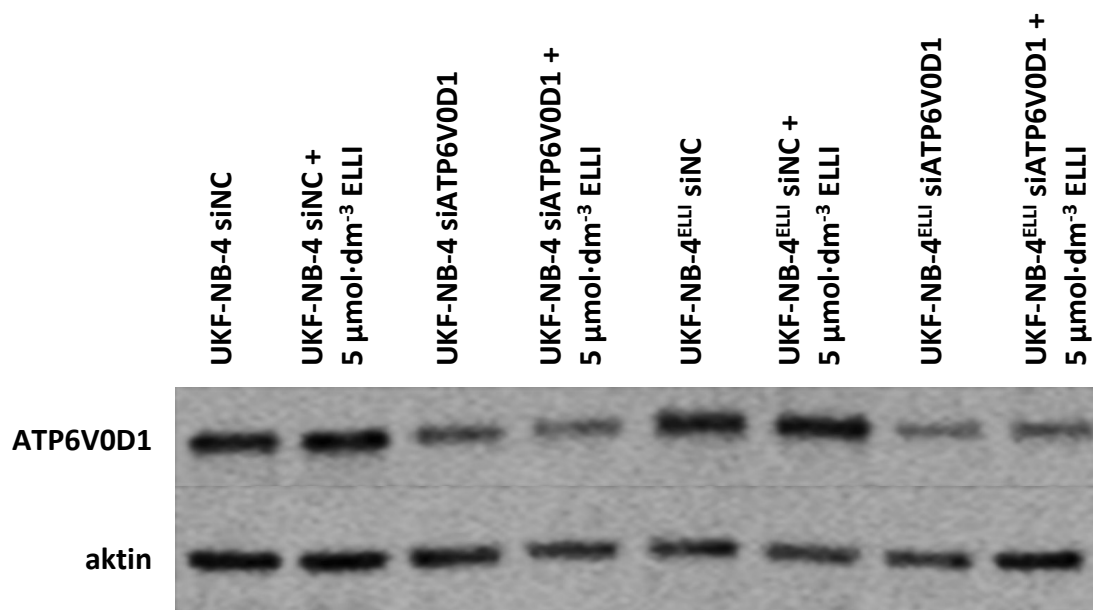


Obr. 12: Stanovení exprese genu *ATP6V0D1* v neuroblastomové buněčné linii senzitivní (UKF-NB-4) a rezistentní (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>) a po jejich ovlivnění ellipticinem. K – UKF-NB-4; 1 – UKF-NB-4 + 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticin; 2 – UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>; 3 – UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> + 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticin. Signifikance  $p < 0,5$  značena \*, signifikance  $p < 0,01$  značena \*\*. Hodnoty jsou průměrem dvou nezávislých měření (biologický duplikát), data jsou vyhodnocena softwarem REST-384-beta. Statistické zpracování dat bylo taktéž provedeno v softwaru REST-348-beta.

## 4.2 Ověření úspěšnosti transfekce buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> siRNA (siATP6V0D1)

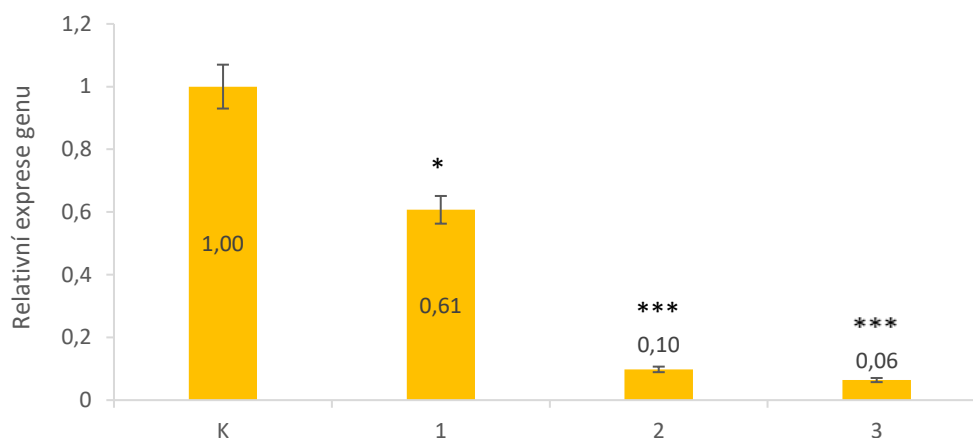
Buňky neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> byly transfekovány molekulami si RNA (siNC nebo siATP6V0D1) a exprese proteinu ATP6V0D1 byla stanovena metodou Western blot. Snímek membrány na *Obr. 13* (str. 53) zachycuje expresi ATP6V0D1 podjednotky V-ATPasy po transfekci buněk siNC (slouží jako kontrola) nebo siATP6V0D1 na proteinové úrovni. Z intenzity zbarvení proužků v jednotlivých sloupcích je patrné úspěšné umlčení genu *ATP6V0D1* v buňkách transfekovaných siATP6V0D1 – v 1., 2., 5. a 6. sloupci, tedy v pozicích, kam byl nanášen vzorek netransfekovaných buněk, je intenzita zbarvení výrazná a mezi sebou bez patrných rozdílů, naopak ve 3., 4., 7. a 8. sloupci, kam byl nanášen vzorek buněk transfekovaných, je intenzita zbarvení méně výrazná a také mezi zmíněnými sloupci srovnatelná. Jako kontrola rovnoměrného množství proteinu ve všech sloupcích byla zkoumána exprese aktinu na proteinové úrovni. Díky nevýrazným rozdílům v intenzitě zbarvení jednotlivých proužků se dá předpokládat množství nanesených proteinů ve všech sloupcích přibližně stejné.

Úspěšnost transfekce buněk byla ověřena také na úrovni nukleových kyselin pomocí polymerasové řetězové reakce sledované v reálném čase. Relativní exprese genu *ATP6V0D1* vakuolární ATPasy (exprese vztažena ke kontrolní linii transfekované siNC, jejíž exprese byla označena jako jednotková) v neuroblastomových liniích transfekovaných molekulami siRNA je zobrazena na grafech níže (*Obr. 14* a *Obr. 15*, str. 54). Na prvním grafu (*Obr. 14*) je znázorněna exprese genu *ATP6V0D1* v senzitivní linii – po ovlivnění kontrolní linie siNC ellipticinem je patrné snížení exprese, avšak pouze s malou statistickou významností. Po transfekci buněk molekulami siATP6V0D1 je pozorováno výrazné snížení exprese genu *ATP6V0D1*, inkubace s ellipticinem nezpůsobila v expresi výrazné změny. Druhý graf (*Obr. 15*) zobrazuje expresi genu *ATP6V0D1* v buňkách rezistentních k ellipticinu. Výsledky v této buněčné linii jsou podobné s výsledky pozorovanými v senzitivních buňkách. Po inkubaci kontrolní linie siNC s ellipticinem bylo pozorováno statisticky významné snížení exprese genu. U buněk transfekovaných molekulami siATP6V0D1 byla exprese výrazně snížena, po inkubaci s ellipticinem nebyla pozorována významná změna. Výsledek je tedy ve shodě s výsledky získanými metodou Western blot, tedy že umlčení genu *ATP6V0D1* proběhlo úspěšně v obou neuroblastomových buněčných liniích.



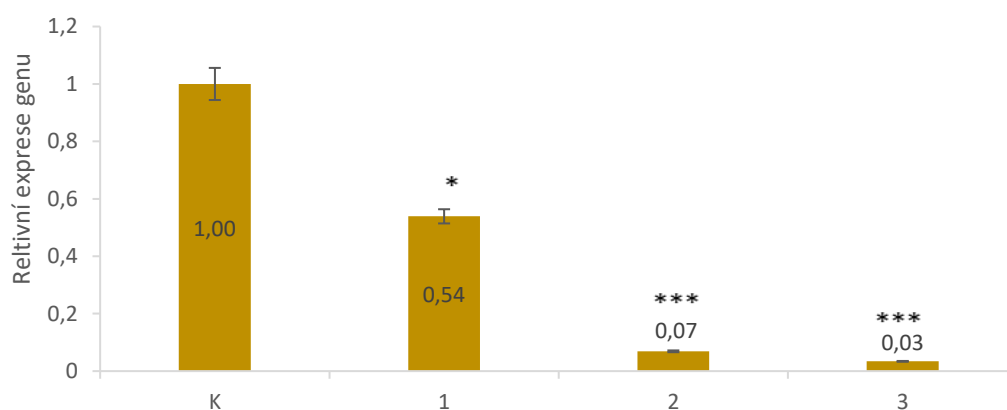
*Obr. 13:* Expres proteinu ATP6V0D1 z enzymového komplexu V-ATPasy v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> transfekovaných molekulami siRNA (48 hodin) a inkubovaných s ellipticinem (24 hodin). Jako kontrola rovnoměrného množství proteinu ve všech vzorcích byl použit aktin. Pořadí vzorků zleva: UKF-NB-4 siNC, UKF-NB-4 siNC inkubované s 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticinem, UKF-NB-4 siATP6V0D1, UKF-NB-4 siATP6V0D1 inkubované s 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticinem, UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> siNC, UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> siNC inkubované s 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticinem, UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> siATP6V0D1 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> siATP6V0D1 inkubované s 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticinem. Pro zobrazení výsledku byl vybrán reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů (biologického triplikátu).

### Expresse genu *ATP6V0D1* v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4



Obr. 14: Expresse genu *ATP6V0D1* membránové domény enzymu V-ATPasy v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 transfekované molekulami siRNA. K – UKF-NB-4 siNC, zvoleno jako kontrola; 1 – UKF-NB-4 siNC inkubované 24 hodin s  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrací ellipticinu; 2 – UKF-NB-4 siATP6V0D1; 3 – UKF-NB-4 siATP6V0D1 inkubované 24 hodin s  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrací ellipticinu. Signifikance  $p < 0,5$  značena \*, signifikance  $p < 0,001$  značena \*\*\*. Hodnoty jsou průměrem dvou nezávislých měření (biologický duplikát), data jsou vyhodnocena softwarem REST-384-beta. Statistické vyhodnocení výsledů bylo taktéž provedeno v softwaru REST-384-beta.

### Expresse genu *ATP6V0D1* v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>



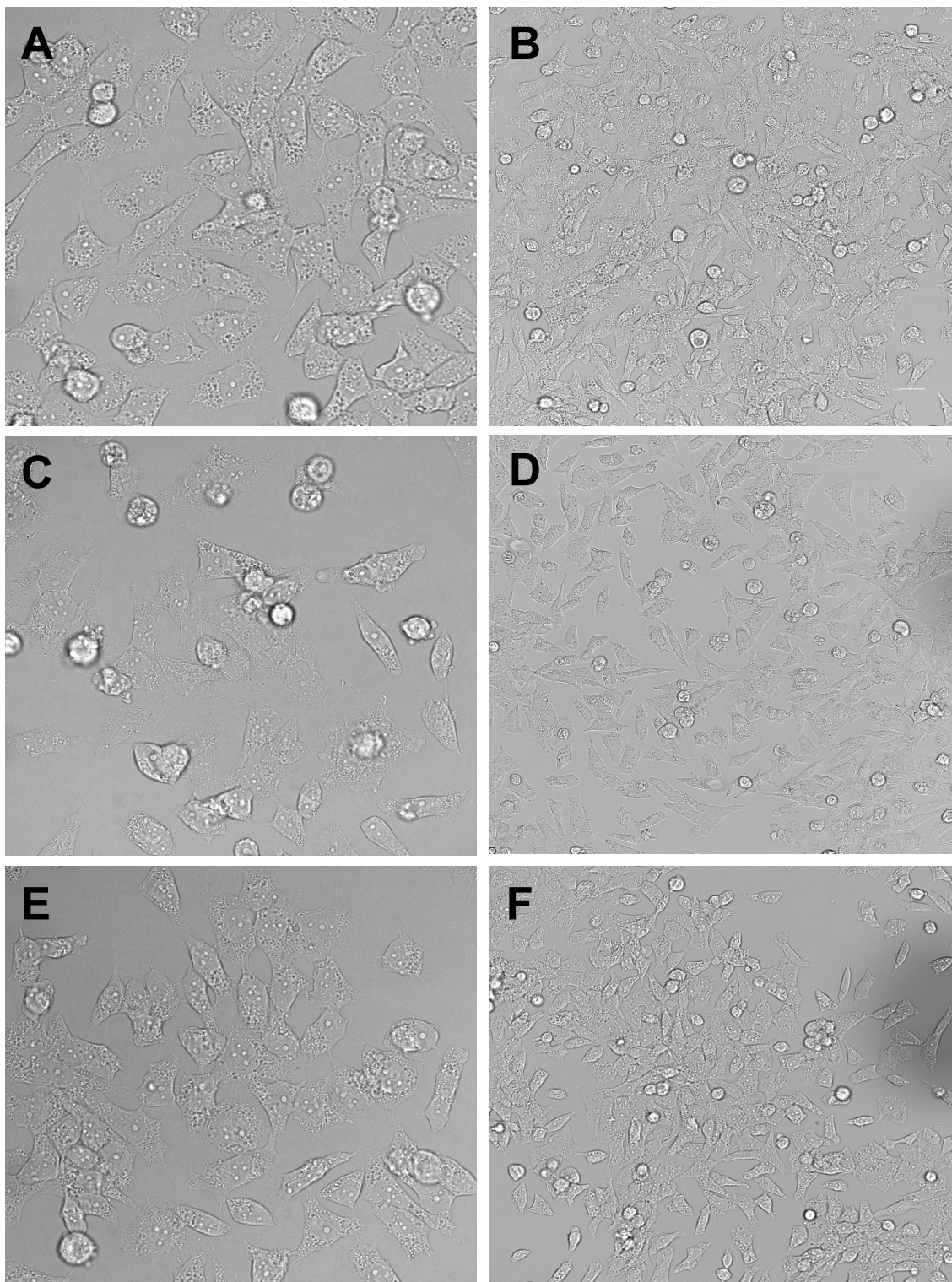
Obr. 15: Expresse genu *ATP6V0D1* membránové domény enzymu V-ATPasy v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> transfekované molekulami siRNA. K – UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> siNC, zvoleno jako kontrola; 1 – UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> siNC inkubované 24 hodin s  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrací ellipticinu; 2 – UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> siATP6V0D1; 3 – UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> siATP6V0D1 inkubované 24 hodin s  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrací ellipticinu. Signifikance  $p < 0,5$  značena \*, signifikance  $p < 0,001$  značena \*\*\*. Hodnoty jsou průměrem dvou nezávislých měření (biologický duplikát), data jsou vyhodnocena softwarem REST-384-beta. Statistické vyhodnocení výsledů bylo taktéž provedeno v softwaru REST-384-beta.

### 4.3 Sledování vlivu transfekce buněk vybranými siRNA na jejich viabilitu a subcelulární lokalizaci ellipticinu

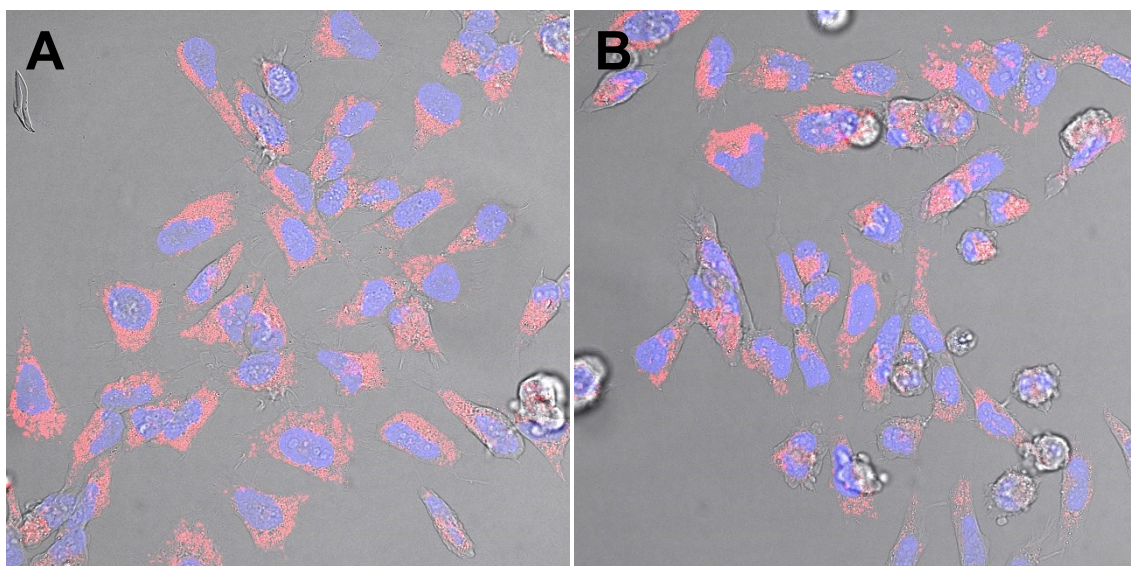
Cytostatikum ellipticin má fluorescenční vlastnosti, díky tomu lze sledovat jeho lokalizaci v buňkách *in vivo* fluorescenčním mikroskopem. Jak bylo již zmíněno výše, ellipticin se interkaluje do DNA, ale také se hromadí v organelách s nízkým pH, čímž pravděpodobně přispívá k rezistenci buněk k léčbě mechanismem lysosomální sekvestrace, do které se zapojuje i zvýšená funkce V-ATPasy.

Transfekované buňky byly 24 hodin inkubovány s ellipticinem a následně vyšetřeny fluorescenčním konfokálním mikroskopem. Ve vzorcích byl sledován počet buněk, který se jevil u obou buněčných linií UKF-NB-4 i UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> po transfekci molekulami siATP6V0D1 menší než u kontrolních vzorků transfekovaných molekulami siNC. Tento jev byl následně ověřen dalšími metodami (viz kapitoly 4.4–4.5).

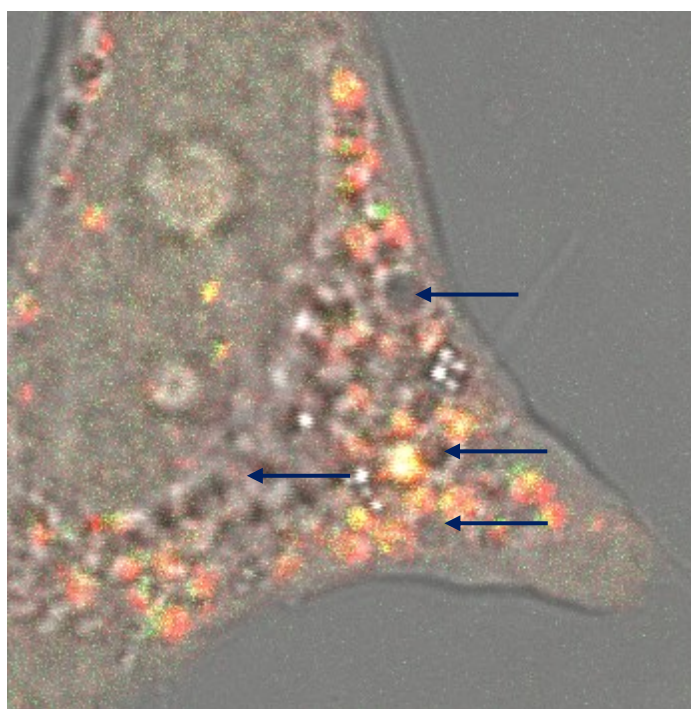
Pozorovány byly i změny v buněčné morfoloii a viabilitě neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 transfekované různými molekulami siRNA a následně ovlivněné ellipticinem (*Obr. 16*, str. 56). U vzorků transfekovaných molekulami siNC nebo siATP6V1H1 byla po ovlivnění ellipticinu pozorována četná tvorba vakuol, zatímco u buněk transfekovaných molekulami siATP6V0D1 byla tvorba vakuol menší. Dále byl také ve vzorku buněk ovlivněných molekulou siATP6V0D1 pozorován menší počet živých buněk než ve zbylých dvou vzorcích. Po inkubaci buněk UKF-NB-4 siNC nebo siATP6V0D1 pouze se specifickými markery (Hoechst 33342 a LysoTracker Red) nebyla ve vzorcích indukována vakuolizace (*Obr. 17*, str. 57). Přítomnost ellipticinu v lysosomech byla konfokálním mikroskopem zkoumána označením lysosomů specifickým markerem LysoTracker Red (*Obr. 18*, str. 57). Žlutá barva značící kolokalizaci ellipticinu a LysoTrackeru Red v lysosomech se nevyskytuje v pozorovaných vakuolách, což svědčí pro jejich nelysosomální původ.



*Obr. 16:* Snímky buněk neuroblastomové linie UKF-NB-4 inkubovaných s molekulami siRNA a následně 24 hodin s  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrací ellipticinu pořízené konfokálním mikroskopem. A – UKF-NB-4 siNC +  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticin, zvětšení 630 $\times$ ; B – UKF-NB-4 siNC +  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticin, zvětšení 200 $\times$ ; C – UKF-NB-4 siATP6V0D1 +  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticin, zvětšení 630 $\times$ ; D – UKF-NB-4 siATP6V0D1 +  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticin, zvětšení 200 $\times$ ; E – UKF-NB-4 siATP6V1H1 +  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticin, zvětšení 630 $\times$ ; F – UKF-NB-4 siATP6V1H1 +  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ellipticin, zvětšení 200 $\times$ . Reprezentativní snímky jednoho ze tří nezávislých pozorování.



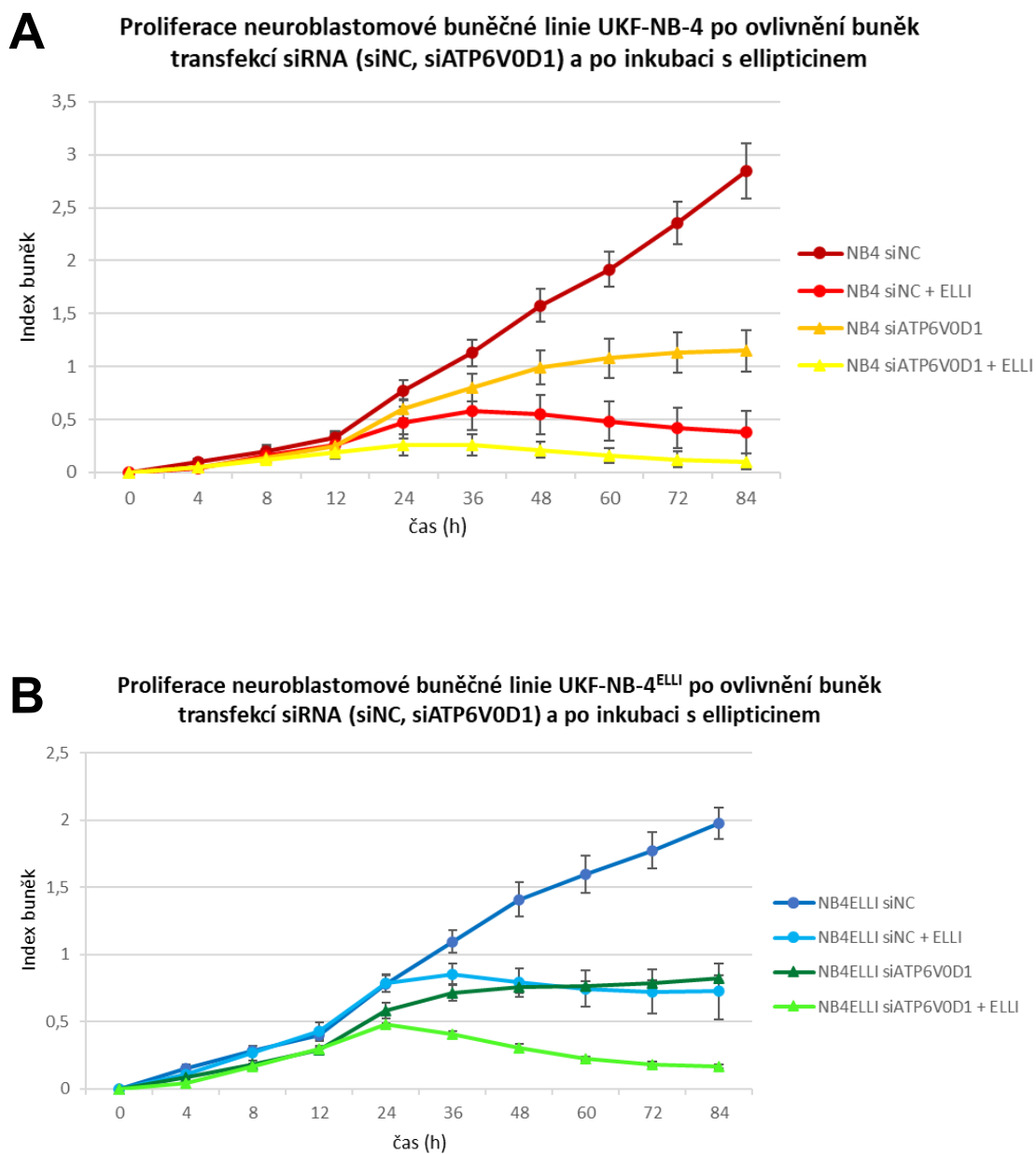
*Obr. 17:* Snímky buněk neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 inkubovaných s siRNA a následně označených specifickými markery Hoechst 33342 (modré zbarvení, značí jádra) a LysoTracker Red (červené zbarvení, značí lysosomy). A – UKF-NB-4 siNC, zvětšení 630×; B – UKF-NB-4 siATP6V0D1, zvětšení 630×. Reprezentativní snímky ze tří nezávislých pozorování.



*Obr. 18:* Snímek buňky neuroblastomové linie UKF-NB-4 transfekované molekulami siNC, následně inkubované 24 hodin s ellipticinem o koncentraci  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a poté inkubované s lysosomálním markerem LysoTracker Red o koncentraci  $25 \text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pořízený konfokálním mikroskopem. Žlutá barva znázorňuje kolokalizaci (překryv) ellipticinu a LysoTrackeru Red; modré šipky upozorňují na vakuoly neznámého původu vzniklé transfekcí a podáním cytostatik.

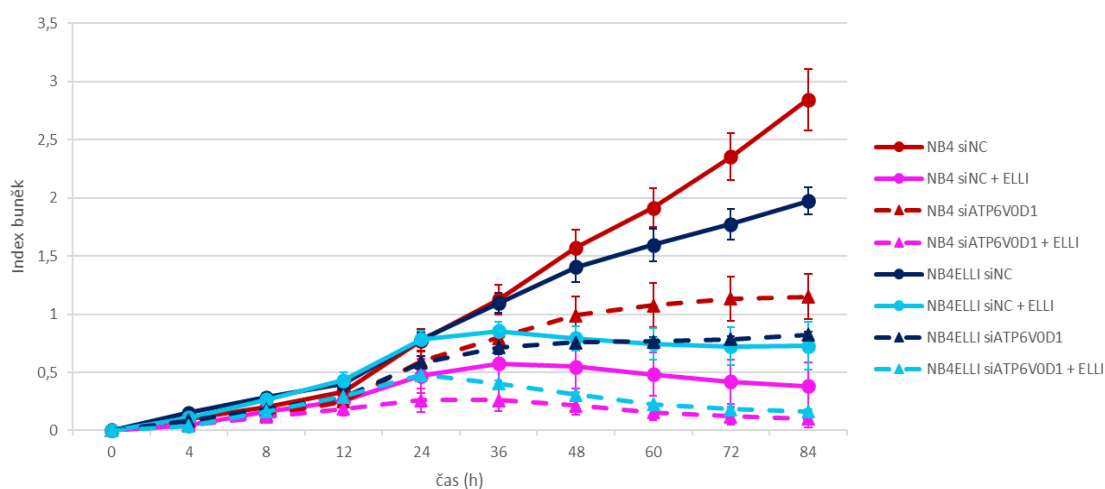
## 4.4 Stanovení proliferace neuroblastomových buněk po jejich transfekci siRNA a inkubaci s ellipticinem

Po pozorování změn v buněčné populaci pomocí konfokálního mikroskopu byla proliferace buněk neuroblastomových linií hodnocena v reálném čase pomocí systému xCELLigence. Výsledky experimentů pro jednotlivé linie jsou shrnuty na *Obr. 19 A–B* (str. 59), souhrn obou linií je pak zobrazen na *Obr. 20* (str. 60). V senzitivní i rezistentní neuroblastomové linií bylo pozorováno výrazné snížení proliferace ve vzorcích buněk siATP6V0D1 v porovnání s příslušnými vzorky siNC. Toto potvrzuje již popsání pozorování z konfokálního mikroskopu (viz kap. 4.3). Také inkubace transfekovaných buněk s ellipticinem výrazně snížila jejich proliferaci, nejnižší proliferační schopnost byla pozorována u obou buněčných linií transfekovaných molekulami siATP6V0D1 a následně inkubovaných s ellipticinem. Ze souhrnného grafu (*Obr. 20*, str. 60) je patrné, že nejvyšší proliferaci vykazovaly kontrolní buňky ze senzitivní neuroblastomové linie, které byly transfekované molekulami siNC a následně buňky rezistentní transfekované siNC. Naopak nejnižší schopnost proliferace vykazovaly senzitivní buňky UKF-NB-4 transfekované molekulami siATP6V0D1 a inkubované s ellipticinem, jejich proliferační schopnost je ale téměř srovnatelná s proliferací rezistentních buněk transfekovaných siATP6V0D1 a inkubovaných s ellipticinem – toto poukazuje na možnost zvratu rezistence buněk UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> k ellipticinu potlačením exprese V<sub>0d</sub> podjednotky vakuolární ATPasy.



Obr. 19: Vliv transfekce neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 (A) a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> (B) molekulami siNC nebo siATP6V0D1 a následné inkubace vzorků s ellipticinem o koncentraci  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  na proliferační schopnosti buněk sledováním jejich počtu v reálném čase pomocí systému xCELLigence. Reprezentativní experiment ze dvou nezávislých měření, získané výsledky byly statisticky zpracovány v tabulkovém softwaru Microsoft Excel.

### Porovnání proliferace neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> po jejich ovlivnění transfekcí siRNA (siNC, siATP6V0D1) a po přidání ellipticinu

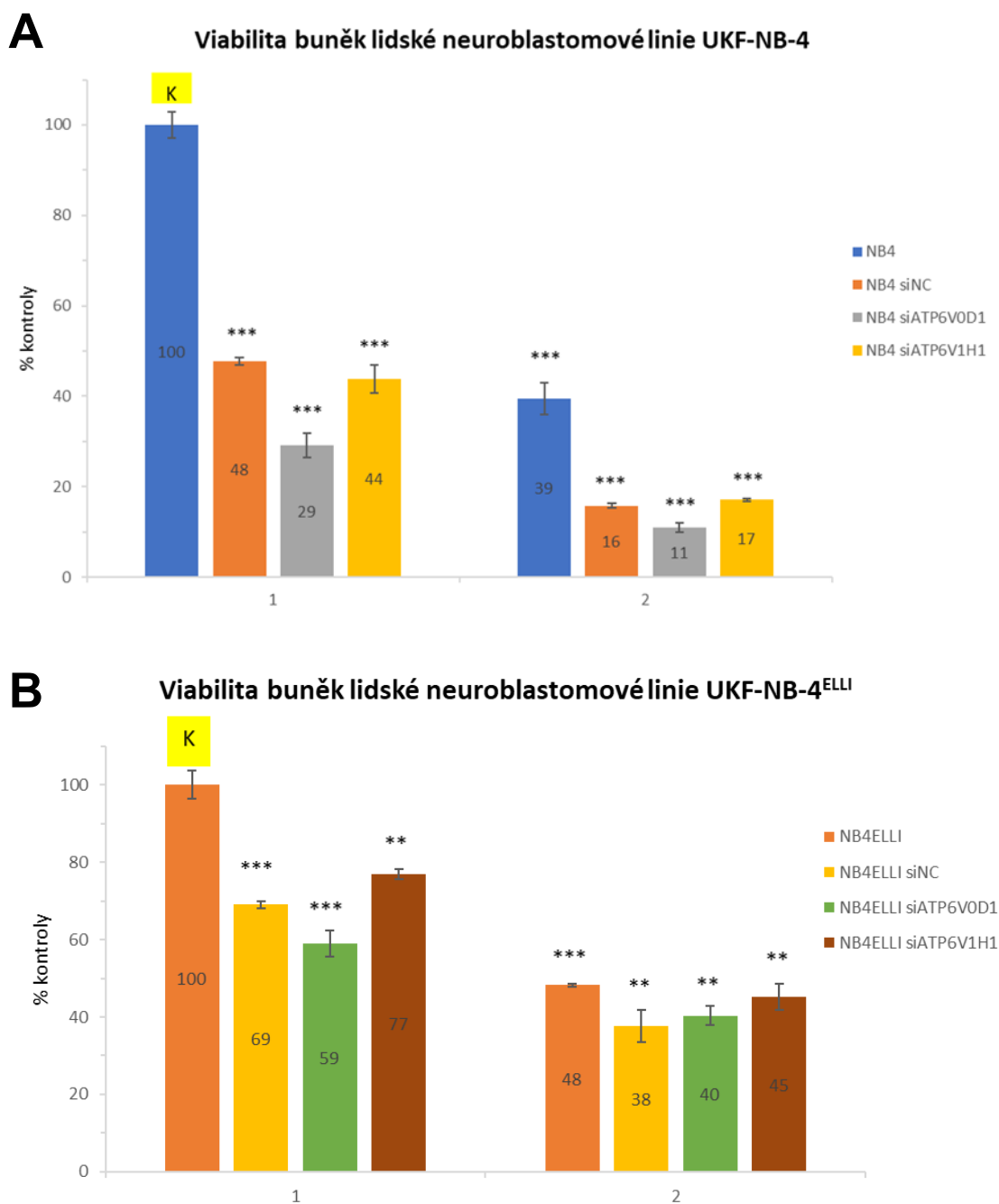


Obr. 20: Souhrnný graf zobrazující porovnání vlivu transfekce neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> molekulami siNC nebo siATP6V0D1 a následné inkubace vzorků s ellipticinem o koncentraci 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  na proliferační schopnosti buněk sledováním jejich počtu v reálném čase pomocí systému xCELLigence. Reprezentativní experiment ze dvou nezávislých měření. Získané výsledky byly statisticky zpracovány v tabulkovém softwaru Microsoft Excel.

## 4.5 Stanovení viability neuroblastomových buněk po jejich transfekci siRNA a po inkubaci s ellipticinem

Metoda využívající systém xCELLigence popsána v předchozí kapitole zaznamenává kromě buněčné proliferace i morfologické změny buněk, proto byla k potvrzení získaných výsledků zvolena metoda sledující pouze viabilitu buněk pomocí činidla PrestoBlue. Výsledky experimentu jsou znázorněny na Obr. 21 A–B (str. 61). Pro porovnání vlivu transfekce buněk na jejich viabilitu byly v tomto experimentu pozorovány také buňky, které nebyly ovlivněny molekulami siRNA. Ze grafů je patrné, že samotná transfekce buněk má vliv na jejich viabilitu, rozdíl ve viabilitě mezi transfekovanými a netransfekovanými buňkami je výraznější u senzitivní neuroblastomové linie (Obr. 21A, str. 61). Dále je z obou grafů patrné, že vliv transfekce buněk molekulami siNC a siATP6V1H1 je vzájemně srovnatelný, nejnižší schopnost přežívání vykazovaly buňky transfekované molekulami siATP6V0D1 a následně inkubované s ellipticinem. Tento výsledek je v souladu s pozorováním v předchozí

kapitole a potvrzuje možnost zvratu rezistence buněk UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> k ellipticinu umlčením genu *ATP6VOD1*.



Obr. 21: Stanovení viability buněk pomocí činidla PrestoBlue v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 (A) a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> (B) inkubovaných s molekulami siRNA a následně 48 hodin s 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrací ellipticinu. Jako kontrolní linie (K) byly zvoleny buňky, které nebyly transfekovány molekulami siRNA, všechny ostatní hodnoty byly vztaženy k této kontrolní linii. 1 – buňky ovlivněné transfekcí příslušnou siRNA; 2 – buňky transfekované příslušnou siRNA a následně inkubované s 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrací ellipticinu. Signifikance  $p < 0,01$  značena \*\*, signifikance  $p < 0,001$  značena \*\*\*. Hodnoty jsou průměrem dvou nezávislých měření a data byla statisticky vyhodnocena v tabulkovém softwaru Microsoft Excel, významnost výsledků byla vyhodnocena párovým t-testem.

## 5 Diskuze

Nádorová onemocnění jsou spolu s dalšími civilizačními chorobami celosvětově narůstajícím problémem, a to i navzdory vědeckému pokroku ve studiu nádorových buněk, jejich mechanismů a s tímto spojeným zlepšením diagnostiky a léčebných postupů v onkologii. Jedním z důvodů, proč jsou nádory stále obtížně léčitelné, je vývoj rezistence k podávaným cytostatikům. Protonová pumpa vakuolární ATPasy (V-ATPasy) je enzym složený z 13 podjednotek, který svou funkcí přispívá k mechanismům rezistence, a to především acidifikací lysosomů, která je významná pro sekvestraci podávaných cytostatik [35].

Cílem této diplomové práce bylo zkoumání příspěvku membránové podjednotky V-ATPasy  $V_{0d}$  k mechanismům rezistence nádorových buněk k ellipticinu a možnosti jejich zvratu ovlivněním zmíněné podjednotky. Experimenty byly prováděny na buňkách lidských neuroblastomových linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> (linie senzitivní a rezistentní vůči ellipticinu), které byly transfekovány molekulami siRNA (konkrétně siNC, siATP6V0D1 nebo siATP6V1H1) a následně inkubovány s ellipticinem o koncentraci  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Rotace podjednotky  $V_{0d}$  je v komplexu kruciólní pro transmembránový přenos protonů, proto byl zkoumán možný vztah mezi tímto proteinem a rezistencí buněk k ellipticinu. Ellipticin je bazické cytostatikum, které se interkaluje do DNA, inhibuje topoisomerasy II a vytváří adukty s DNA. Při nadměrném okyselení vnitřního prostředí lysosomů se v nich akumuluje, a tak se nedostane do své cílové struktury. Podjednotka  $V_{1H}$  je zodpovědná za udržení V-ATPasy ve složeném celku, který je enzymaticky funkční. Studie již prokázaly, že V-ATPasa postrádající  $V_{1H}$  podjednotku ztrácí schopnost transmembránového přenosu protonů [53]. Ovlivňování buněk molekulami siATP6V1H1, tedy umlčení genu pro  $V_{1H}$  podjednotku, bylo využito k porovnání vlastností buněk postrádajících aktivitu V-ATPasy a buněk s umlčeným genem podjednotky  $V_{0d}$ .

Metodou kvantitativní RT-PCR byla nejprve zkoumána exprese podjednotky  $V_{0d}$  na úrovni mRNA. Buňky neuroblastomových linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> byly vystaveny působení ellipticinu o koncentraci  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Zatímco v senzitivní linii UKF-NB-4 byla po působení ellipticinu exprese genu *ATP6V0D1* snížena, v buňkách rezistentních (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>) byla pozorována zvýšená exprese sledovaného genu, která se po inkubaci s ellipticinem prakticky neměnila (*Obr. 12*, str. 51). Tento výsledek

podporuje předpoklad, že  $V_0d$  podjednotka V-ATPasy hraje důležitou roli v mechanismu rezistence neuroblastomových buněk k ellipticinu.

V dalším experimentu byla provedena transfekce buněk molekulami siRNA a ověřena úspěšnost umlčení příslušných genů, a to jak na proteinové úrovni metodou Western blot, tak na úrovni mRNA pomocí kvantitativní RT-PCR. U obou neuroblastomových linií (UKF-NB-4 i UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>) ovlivněných siNC nebyly po inkubaci s 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  koncentrací ellipticinu pozorovány změny na proteinové úrovni, na úrovni mRNA byly pozorované změny významné. Avšak po transfekci těchto buněk molekulami siATP6V0D1 a po ovlivnění transfekovaných buněk ellipticinem byla exprese  $V_0d$  proteinu a příslušné mRNA oproti buňkám transfekovaným siNC výrazně snížena (Obr. 13–15, str. 53–54). Z daných výsledků je tedy prokazatelné úspěšné umlčení genu *ATP6V0D1*.

Následně byl vliv transfekce molekulami siRNA a ellipticinu sledován v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> pomocí konfokální mikroskopie. Cytostatikum ellipticin má fluorescenční vlastnosti, proto ho lze v buňkách lokalizovat. Pozorováním buněk UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> po umlčení genu *ATP6V0D1* a ovlivněných ellipticinem byly objeveny změny v četnosti buněčné populace – u obou linií byl po transfekci siATP6V0D1 počet buněk menší v porovnání s počtem buněk transfekovaných siNC. Z tohoto můžeme usuzovat, že snížená proliferace buněk, změna viability a také potlačení chemorezistence mohou souviset se ztrátou funkce V-ATPasy umlčením genu *ATP6V0D1*. Dále byly porovnávány vzorky buněk UKF-NB-4 ovlivněné molekulami siNC, siATP6V0D1 nebo siATP6V1H1. Vzorky s umlčeným genem *ATP6V1H1* byly přidány pro porovnání vlivu dysfunkce celého komplexu V-ATPasy vlivem chybějící  $V_1H$  podjednotky s vlivem komplexu postrádajícího pouze  $V_0d$  podjednotku. Po inkubaci těchto vzorků s ellipticinem byla pozorována tvorba vakuol v obou buněčných liniích. Překvapivým zjištěním bylo, že vakuolizace byla četnější v buňkách transfekovaných molekulami siNC nebo siATP6V1H1 než v buňkách transfekovaných siATP6V0D1 (Obr. 16, str. 56). Pro identifikaci distribuce ellipticinu v organelách a identifikaci vakuol byly buňky obarveny specifickým markerem lysosomů a dalších kyselých organel LysoTracker Red. Konfokální mikroskopii byl ellipticin kolokalizován se zmíněným specifickým markerem v lysosomech, vzniklé vakuoly však nevykazovaly žádnou fluorescenci – ani ellipticinu ani LysoTrackeru (Obr. 18, str. 57). Původ vakuol tedy nebyl objasněn. Pro ověření, zda dochází k vakuolizaci vlivem kombinace transfekce buněk a jejich následné inkubaci

s ellipticinem, byly buňky po transfekci siRNA obarveny specifickým markerem jader Hoechst 33342 a markerem LysoTracker Red. V těchto vzorcích nebyla tvorba vakuol pozorována (*Obr. 17*, str. 57), čímž jsme potvrdili, že pozorovaná vakuolizace opravdu vznikala důsledkem transfekce buněk a jejich následné inkubaci s ellipticinem. V několika studiích byly popsány cytoplasmické vakuoly vzniklé z mitochondrií či endoplasmatického retikula v rámci „paraptosy“, poměrně nově objeveného mechanismu programované buněčné smrti. Paraptosa je odlišná od apoptosy i nekrosy a je charakterizovaná ztrátou proteostasy a změnami v homeostase  $Ca^{2+}$  iontů způsobující stres ER a mitochondrií či akumulací špatně sbalených proteinů v lumen ER [101], [102]. Zda námi pozorované vakuoly vznikly v důsledku paraptosy bude předmětem dalšího bádání.

Na základě změn v množství buněk po jejich transfekci různými siRNA pozorovaných konfokální mikroskopií byl v dalším experimentu sledován vliv transfekce linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> molekulami siRNA na jejich proliferaci. Proliferace obou buněčných linií ovlivněných molekulami siNC, siATP6V0D1 a ellipticinem byla hodnocena v reálném čase pomocí systému xCELLigence. Již po 12 hodinách inkubace vzorků s ellipticinem můžeme zaznamenat rozdíly v proliferačních schopnostech jednotlivých buněčných modelů (*Obr. 20*, str. 60). Nejvyšší index buněk s lineárním růstem vykazovala linie UKF-NB-4 transfekovaná molekulami siNC, po inkubaci tohoto vzorku s ellipticinem byla však proliferace buněk výrazně redukována. U linie UKF-NB-4 transfekované molekulami siATP6V0D1 byla v porovnání s linií transfekovanou siNC proliferační schopnost poloviční, inkubací UKF-NB-4 siATP6V0D1 s ellipticinem byla zaznamenána nejnižší buněčná proliferace ze všech měřených vzorků (*Obr. 19A*, str. 59). Tento výsledek potvrzuje výše zmíněné změny v četnosti buněčné populace pozorované mikroskopicky u buněk senzitivních k ellipticinu a transfekovaných siNC nebo siATP6V0D1 a také hypotézu, že umlčení genu *ATP6V0D1* může zefektivnit vliv ellipticinu na tyto buňky. Linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> ovlivněná molekulami siNC vykazovala nižší proliferační schopnosti oproti senzitivní linií. Vzorky rezistentní linie transfekované molekulami siNC a ty samé vzorky inkubované s ellipticinem vykazovaly nejprve stejný nárůst, rozdíl způsobený přítomností ellipticinu byl zaznamenán až po 24 hodinách, kdy se zpomalil růst buněk ovlivněných ellipticinem. Míra proliferace linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> po transfekci molekulami siATP6V0D1 byla poměrně nízká a po inkubaci s ellipticinem byla ještě snížena (*Obr. 19B*, str. 59). Získané výsledky naznačují, že samotná transfekce rezistentních

buněk má vliv na jejich proliferační schopnosti, a podobně jako u senzitivní linie, i u těchto buněk se zdá, že umlčením genu *ATP6V0D1* je potencována účinnost ellipticinu, a tedy pravděpodobně zvrácena chemorezistence k danému cytostatiku.

Protože systém xCELLigence zaznamenává morfologické změny buněk spojené nejen s buněčnou smrtí, ale i s růstem a vývojem buněk, bylo pro ověření předchozích závěrů a ke sledování buněčné viability využito hodnocení počtu živých buněk transfekovaných molekulami siNC, siATP6V0D1 nebo siATP6V1H1 a ovlivněných ellipticinem jejich značením PrestoBlue (obsah resazurinu). Činidlo PrestoBlue je v přítomnosti živých buněk redukováno na fluorescenční barvivo (modré barvivo resazurin je přeměněno na červeně fluoreskující resofurin), které je detekováno měřením absorbance při vlnové délce 571 nm [103]. Tento experiment byl proveden nejen na transfekovaných buňkách neuroblastomových linií, ale i na liniích netransfekovaných. Z výsledků vyplývá, že samotná transfekce buněk molekulami siRNA poměrně výrazně ovlivňuje jejich životaschopnost. Nejvýraznější snížení buněčné viability bylo pozorováno po transfekci buněk molekulami siATP6V0D1 v kombinaci s ellipticinem, a to jak v senzitivní linií UKF-NB-4, tak v linií rezistentní k ellipticinu UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> (Obr. 21A–B, str. 61). Tímto se nám opět potvrzuje hypotéza, že absence podjednotky  $V_{0d}$  v komplexu V-ATPasy může zvrátit chemorezistenci buněk k ellipticinu. Efekt ellipticinu na viabilitu buněk byl v liniích ovlivněných molekulami siATP6V0D1 výraznější než v liniích transfekovaných molekulami siATP6V1H1. Je tedy možné, že i přes dysfunkci V-ATPasy jsou mechanismy chemorezistence k cytostatikům určitým způsobem (např. nějakými protein-proteinovými interakcemi) zachovány. To bude předmětem dalšího zkoumání.

## 6 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na sledování vlivu vybrané podjednotky  $V_0d$  z komplexu V-ATPasy na vznik rezistence lidských neuroblastomových linií senzitivní UKF-NB-4 a rezistentní vůči ellipticinu UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>, a to především využitím umlčení genu pro příslušnou podjednotku transfekcí buněk molekulami siRNA. Experimenty bylo dosaženo následujících výsledků.

- V rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> neovlivněné ellipticinem i po 24-hodinové inkubaci s ellipticinem byla metodou RT-PCR pozorována zvýšená exprese genu *ATP6V0D1*.
- Úspěšné umlčení genu *ATP6V0D1* pomocí siRNA v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> bylo prokázáno metodami Western blot a RT-PCR.
- Kombinace transfekce neuroblastomových buněčných linií spolu s působením ellipticinu indukuje vakuolizaci buněk, která byla v senzitivní linii UKF-NB-4 výraznější po ovlivnění buněk molekulami siNC nebo siATP6V1H1 než po ovlivnění molekulami siATP6V0D1. Příčina vzniku vakuol nebyla odhalena, nebyl ale prokázán jejich lysosomální původ. Usuzujeme, že se jedná o paraptosu, tato hypotéza však nebyla z časových důvodů prověřena.
- Transfekce neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> má vliv na snížení proliferačních schopností buněčné populace. Nejvýraznější snížení buněčné proliferace a viability bylo pozorováno u obou linií po umlčení genu *ATP6V0D1* a následné inkubaci buněk s ellipticinem. Z tohoto lze usuzovat, že chemorezistenci neuroblastomových buněk k ellipticinu lze potlačit ovlivněním  $V_0d$  podjednotky v komplexu V-ATPasy.

## Seznam literatury

- [1] World Health Organization: *Cancer*. [On-line]. Dostupné z URL: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> [cit. 24. 2. 2021].
- [2] World Health Organization: *Noncommunicable diseases*. [On-line]. Dostupné z URL: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>> [cit. 24. 2. 2021].
- [3] National Cancer Institute: *What Is Cancer?* [On-line]. Dostupné z: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#how-cancer-arises>> [cit. 27. 2. 2021].
- [4] Soumarová, R.; Kubecová, M.: *ONKOLOGIE*. [Elektronická kniha on-line]. 2nd ed. Praha, Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Radioterapeutická a onkologická klinika 3. LF a FNKV, 2019. Dostupné z URL: <[https://www.lf3.cuni.cz/3LF-1478-version1-2019\\_soumarova\\_onkologie\\_978\\_80\\_87878\\_37.pdf](https://www.lf3.cuni.cz/3LF-1478-version1-2019_soumarova_onkologie_978_80_87878_37.pdf)> [cit. 27. 2. 2021].
- [5] Vyzula, R.; Němeček, R.; Sláma, O.: *Klinická onkologie pro mediky, SOLIDNÍ NÁDORY A NÁDORY DĚTSKÉHO VĚKU*. 2nd ed. Brno, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, 2018.
- [6] Krejci, D.; Zapletalova, M.; Svobodova, I.; Pehalova, L.; Muzik, J.; Klimes, D.; Snajdrova, L.; Bajciová, V.; Mudry, P.; Kodytkova, D.; Smelhaus, V.; Janotova, I.; Vrzalova, A.; Luks, A.; Sterba, J.; Sary, J.; Dusek, L.: Epidemiologické trendy onkologických onemocnění u dětí a adolescentů v období 1994-2016 v České republice. *Klin. Onkol.* 32:6, 426–435 (2019).
- [7] Baba, A. I.; Cătoi, C.: *Comparative Oncology*. Bucharest, The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
- [8] Hulín I.: *Pathophysiology*. Bratislava, SAP, 1997.
- [9] McCance, K. L.; Mooney, K. H.; Roberts, L. K.: Tumor biology. In: *Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease in Adults and Children*. St Louis, MO: C. V. Mosby, 1990. ISBN 978-0801633607.
- [10] Park, J. R.; Eggert, A.; Caron, H.: Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. *Pediatr. Clin. North Am.* 55:1, 97–120 (2008).
- [11] Colon, N. C.; Chung, D. H.: Neuroblastoma. *Advances in Pediatrics*. 58:1. 297–311 (2011).

- [12] Stottmann, R. W.; Klingensmith, J.: Bone morphogenetic protein signaling is required in the dorsal neural folds before neurulation for the induction of spinal neural crest cells and dorsal neurons. *Dev. Dyn.* 240:4, 755–765 (2011).
- [13] Leung, A. W.; Murdoch, B.; Salem, A. F.; Prasad, M. S.; Gomez, G. A.; García-Castro, M. I.: WNT/ $\beta$ -catenin signaling mediates human neural crest induction via a pre-neural border intermediate. *Dev.* 143:3, 398–410 (2016).
- [14] Du, Y.; Yip, H.: Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation. *Differentiation.* 79:2, 84–92 (2010).
- [15] Ota, C.; Baarsma, H. A.; Wagner, D. E.; Hilgendorff, A.; Königshoff, M.: Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling. *Mol. Cell. Pediatr.* 3:1 (2016).
- [16] Wang, R.; Sun, Q.; Wang, P.; Liu, M.; Xiong, S.; Luo, J.; Huang, H.; Du, Q.; Geller, D. A.; Cheng, B.: Notch and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway play important roles in activating liver cancer stem cells. *Oncotarget.* 7:5, 5754–5768 (2016).
- [17] Dong, H. J.; Jang, G. B.; Lee, H. Y.; Park, S. R.; Kim, J. Y.; Nam, J. S.; Hong, I. S.: The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling/Id2 cascade mediates the effects of hypoxia on the hierarchy of colorectal-cancer stem cells. *Sci. Rep.* 6:1 (2016).
- [18] Vangipuram, S. D.; Buck, S. A.; Lyman, W. D.: Wnt pathway activity confers chemoresistance to cancer stem-like cells in a neuroblastoma cell line. *Tumour Biol.* 33:6, 2173–2183 (2012).
- [19] Ornitz, D. M.; Itoh, N.: The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4:3, 215–266 (2015).
- [20] Villarino, A. V.; Kanno, Y.; Ferdinand, J. R.; O’Shea, J. J.: Mechanisms of Jak/STAT Signaling in Immunity and Disease. *J. Immunol.* 194:1, 21–27 (2015).
- [21] Chang, H. H.; Lee, H.; Hu, M. K.; Tsao, P. N.; Juan, H. F.; Huang, M. C.; Shih, Y. Y.; Wang, B. J.; Jeng, Y. M.; Chang, C. L.; Huang, S. F.; Tsay, Y. G.; Hsieh, F. J.; Lin, K. H.; Hsu, W. M.; Liao, Y. F.: Notch1 expression predicts an unfavorable prognosis and serves as a therapeutic target of patients with neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 16:17, 4411–4420 (2010).
- [22] Tomolonis, J. A.; Agarwal, S.; Shohet, J. M.: Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development. *Cell and Tissue Research.* 372:2, 245–262 (2018).

- [23] Bray, S. J.: Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:9, 678–689 (2006).
- [24] Modak, S.; Cheung, N. K. V.: Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat. Rev.* 36:4, 307–317 (2010).
- [25] Brodeur, G. M.: Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer.* 3:1, 203 (2003).
- [26] Ishola, T. A.; Chung, D. H.: Neuroblastoma. *Surg. Oncol.* 16:3, 149–156 (2007).
- [27] Goto, S.; Umehara, S.; Gerbing, R. B.; Stram, D. O.; Brodeur, G. M.; Seeger, R. C.; Lukens, J. N.; Matthay, K. K.; Shimada, H.: Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors: A report from the Children’s Cancer Group. *Cancer.* 92:10, 2699–2708 (2001).
- [28] Kim, S.; Chung, D. H.: Pediatric solid malignancies: neuroblastoma and Wilms’ Tumor. *Surgical Clinics of North America.* 86:2, 469–487 (2006).
- [29] Goodwin, S.; Smith, A. F.; Horning, E. C.: Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill. *J. Am. Chem. Soc.* 81:8, 1903–1908 (1959).
- [30] Auclair, C.: Multimodal action of antitumor agents on DNA: The ellipticine series. *Arch. Biochem. Biophys.* 259:1, 1–14 (1987).
- [31] Fossé, P.; René, B.; Charra, M.; Paoletti, C.; Saucier, J. M.: Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by ellipticine derivatives: structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 42:4, 590–595 (1992).
- [32] Stiborová, M.; Bieler, C. A.; Wiessler, M.; Frei, E.: The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochem. Pharmacol.* 62:12, 1675–1684 (2001).
- [33] Stiborová, M.; Poljaková, J.; Martínková, E.; Bořek-Dohalská, L.; Eckschlager, T.; Kizek, R.; Frei, E.: Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines—a comparative study. *Interdiscip. Toxicol.* 4:2, 98–105 (2011).
- [34] Kuo, P. L.; Hsu, Y. L.; Chang, C. H.; Lin, C. C.: The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Lett.* 223:2, 293–301 (2005).
- [35] Hraběta, J.; Belhajová, M.; Šubrtová, H.; Rodrigo, M. A. M.; Heger, Z.; Eckschlager, T.: Drug sequestration in lysosomes as one of the mechanisms of chemoresistance of cancer cells and the possibilities of its inhibition. *Int J Mol Sci.* 21:12, 1–18 (2020).

- [36] Zheng, H. C.: The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*. 8:35, 59950–59964 (2017).
- [37] Bar-Zeev, M., Livney, Y. D.; Assaraf, Y. G.: Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: Towards precision medicine overcoming drug resistance. *Drug Resist. Updat*. 31:1, 15–30 (2017).
- [38] Saftig, P.: *Lysosomes*. New York, Springer Science & Business Media, 2005.
- [39] Appelqvist, H.; Wäster, P.; Kågedal, K.; Öllinger, K.: The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target. *J. Mol. Cell Biol*. 5:4, 214–226 (2013).
- [40] Kallunki, T.; Olsen, O. D.; Jäättelä, M.: Cancer-associated lysosomal changes: Friends or foes? *Oncogene*. 32:16, 1995–2004 (2013).
- [41] Macintyre, A. C.; Cutler, D. J.: The potential role of lysosomes in tissue distribution of weak bases. *Biopharm. Drug Dispos*. 9:6, 513–526 (1988).
- [42] Kazmi, F.; Hensley, T.; Pope, C.; Funk, R. S.; Loewen, G. J.; Buckley, D. B.; Parkinson, A.: Lysosomal sequestration (trapping) of lipophilic amine (cationic amphiphilic) drugs in immortalized human hepatocytes (Fa2N-4 cells). *Drug Metab. Dispos*. 41:4, 897–905 (2013).
- [43] Zhitomirsky B.; Y. G. Assaraf, Y. G.: Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosomedependent cancer multidrug resistance. *Oncotarget*. 6:2, 1143–1156, (2015).
- [44] Zhitomirsky, B.; Assaraf, Y. G.: Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer. *Drug Resist. Updat*. 24:1, 23–33 (2016).
- [45] Zhitomirsky, B.; Assaraf, Y. G.: The role of cytoplasmic-to-lysosomal pH gradient in hydrophobic weak base drug sequestration in lysosomes. *Cancer Cell Microenviron*. 2:1, 807 (2015).
- [46] Hrabeta, J.; Groh, T.; Khalil, M. A.; Poljakova, J.; Adam, V.; Kizek, R.; Uhlik, J.; Doktorova, H.; Cerna, T.; Frei, E.; Stiborova, M.; Eckschlager, T.: Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells. *Int. J. Oncol*. 47:3, 971–980 (2015).
- [47] Molinari, A.; Calcabrini, A.; Meschini, S.; Stringaro, A.; Crateri, P.; Toccaceli, L.; Marra, M.; Colone, M.; Cianfriglia, M.; Arancia, G.: Subcellular Detection and Localization of the Drug Transporter P-Glycoprotein in Cultured Tumor Cells. *Curr. Protein Pept. Sci*. 3:6, 653–670 (2005).

- [48] Oot, R. A.; Couoh-Cardel, S.; Sharma, S.; Stam, N. J.; Wilkens, S.: Breaking up and making up: The secret life of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Protein Sci.* 26:5, 896–909 (2017).
- [49] Futai, M.; Sun-Wada, G. H.; Wada, Y.; Matsumoto, N.; Nakanishi-Matsui, M.: “Vacuolar-type ATPase: A proton pump to lysosomal trafficking. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 95:6, 261–277 (2019).
- [50] Marshansky, V.; Rubinstein, J. L.; Grüber, G.: Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837:6, 857–879 (2014).
- [51] Stransky, L.; Cotter, K.; Forgac, M.: The function of V-ATPases in cancer. *Physiol. Rev.* 96:3, 1071–1091 (2016).
- [52] MacLeod, K. J.; Vasilyeva, E.; Baleja, J. D.; Forgac, M.: Mutational analysis of the nucleotide binding sites of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 273:1, 150–156 (1998).
- [53] Cipriano, D. J.; Wang, Y.; Bond, S.; Hinton, A.; Jefferies, K. C.; Qi, J.; Forgac, M.: Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777:8, 599–604 (2008).
- [54] Hirata, R.; Graham, L. A.; Takatsuki, A.; Stevens, T. H.; Anraku, Y.: VMA11 and VMA16 encode second and third proteolipid subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272:8, 4795–4803 (1997).
- [55] Toei, M.; Toei, S.; Forgac, M.: Definition of membrane topology and identification of residues important for transport in subunit a of the vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* 286:40, 35176–35186 (2011).
- [56] Ludwig, J.; Kerscher, S.; Brandt, U.; Pfeiffer, K.; Getlawi, F.; Apps, D. K.; Schägger, H.: Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 273:18, 10939–10947 (1998).
- [57] Lu, M.; Ammar, D.; Ives, H.; Albrecht, F.; Gluck, S. L.: Physical interaction between aldolase and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *J. Biol. Chem.* 282:34, 24495–24503 (2007).

- [58] Pisoni, R. L.; Thoene, J. G.; Christensen, H. N.: Detection and Characterization of Carrier-mediated Cationic Amino Acid Transport in Lysosomes of Normal and Cystinotic Human Fibroblasts. Role in therapeutic cystine removal? *J. Biol. Chem.* 260:8, 4791–4798 (1985).
- [59] Frattini, A.; Orchard, P. J.; Sobacchi, C.; Giliani, S.; Abinun, M.; Mattsson, J. P.; Keeling, D. J.; Andersson, A. K.; Wallbrandt, P.; Zecca, L.; Notarangelo, L. D.; Vezzoni, P.; Villa, A.: Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat. Genet.* 25:3, 343–346 (2000).
- [60] Nanda, A.; Brumell, J. H.; Nordström, T.; Kjeldsen, L.; Sengeløv, H.; Borregaard, N.; Rotstem, O. D.; Grinstein, S.: Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPases. *J. Biol. Chem.* 271:27, 15963–15970 (1996).
- [61] Sennoune, S. R.; Bakunts, K.; Martínez, G. M.; Chua-Tuan, J. L.; Kebir, Y.; Attaya, M. N.; Martínez-Zaguilán, R.: Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: Distribution and functional activity. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 286:6, 55-56 (2004).
- [62] Bernard, D.; Gebbia, M.; Prabha, S.; Gronda, M.; MacLean, N.; Wang, X.; Hurren, R.; Sukhai, M. A.; Cho, E. E.; Manolson, M. F.; Datti, A.; Wrana, J.; Minden, M. D.; Al-Awar, R.; Aman, A.; Nislow, C.; Giaever, G.; Schimmer, A. D.: Select microtubule inhibitors increase lysosome acidity and promote lysosomal disruption in acute myeloid leukemia (AML) cells. *Apoptosis.* 20:7, 948–959 (2015).
- [63] Capecchi, J.; Forgac, M.: The function of vacuolar ATPase (V-ATPase) a subunit isoforms in invasiveness of MCF10a and MCF10CA1a human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 288:45, 32731–32741 (2013).
- [64] Shen, W.; Zou, X.; Chen, M.; Liu, P.; Shen, Y.; Huang, S.; Guo, H.; Zhang, L.: Effects of dipyllin as a novel V-ATPase inhibitor on gastric adenocarcinoma. *Eur. J. Pharmacol.* 667:3, 330–338 (2011).
- [65] Kissing, S.; Hermsen, C.; Repnik, U.; Nasset, C. K.; Von Bargen, K.; Griffiths, G.; Ichihara, A.; Lee, B. S.; Schwake, M.; De Brabander, J.; Haas, A.; Saftig, P.: Vacuolar ATPase in phagosome-lysosome fusion. *J. Biol. Chem.* 290:22, 14166–14180 (2015).

- [66] Pamarthy, S.; Kulshrestha, A.; Katara, G. K.; Beaman, K. D.: The curious case of vacuolar ATPase: Regulation of signaling pathways. *Mol. Cancer*. 17:1 (2018).
- [67] Sorensen, E. B.; Conner, S. D.:  $\gamma$ -secretase-dependent cleavage initiates notch signaling from the plasma membrane. *Traffic*. 11:9, 1234–1245 (2010).
- [68] Lee, J. H.; Yu, W. H.; Kumar, A.; Lee, S.; Mohan, P. S.; Peterhoff, C. M.; Wolfe, D. M.; Martinez-Vicente, M.; Massey, A. C.; Sovak, G.; Uchiyama, Y.; Westaway, D.; Cuervo, A. M.; Nixon, R.: Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*. 141:7, 1146–1158 (2010).
- [69] Polakis, P.: Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:5, 9 (2012).
- [70] Ichihara, A.: (Pro)renin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Keio J. Med.* 61:3, 73–78 (2012).
- [71] Rousselle, A.; Sihh, G.; Rotteveel, M.; Bader, M.: (Pro)renin receptor and V-ATPase: From drosophila to humans. *Clin. Sci.* 126:8, 529–536 (2014).
- [72] Gao, C.; Cao, W.; Bao, L.; Zuo, W.; Xie, G.; Cai, T.; Fu, W.; Zhang, J.; Wu, W.; Zhang, X.; Chen, Y. G.: Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat. Cell Biol.* 12:8, 781–790 (2010).
- [73] Moschetta, M.; Reale, A.; Marasco, C.; Vacca, A.; Carratù, M. R.: Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: Benefits and limitations. *Br. J. Pharmacol.* 171:16, 3801–3813 (2014).
- [74] McConnell, M.; Feng, S.; Chen, W.; Zhu, G.; Shen, D.; Ponnazhagan, S.; Deng, L.; Li, Y. P.: Osteoclast proton pump regulator Atp6v1c1 enhances breast cancer growth by activating the mTORC1 pathway and bone metastasis by increasing V-ATPase activity. *Oncotarget*. 8:29, 47675–47690 (2017).
- [75] Wojtkowiak, J. W.; Verduzco, D.; Schramm, K. J.; Gillies, R. J.: Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol. Pharm.* 8:6, 2032–2038 (2011).
- [76] Lu, Q.; Lu, S.; Huang, L.; Wang, T.; Wan, Y.; Zhou, C. X.; Zhang, C.; Zhang, Z.; Li, X.: The expression of V-ATPase is associated with drug resistance and pathology of non-small-cell lung cancer. *Diagn. Pathol.* 8:1, 824 (2013).
- [77] Altan, N.; Chen, Y.; Schindler, M.; Simon, S. M.: Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *J. Exp. Med.* 187:10, 1583–1598 (1998).

- [78] Tycko, B.; Maxfield, F. R.: Rapid acidification of endocytic vesicles containing  $\alpha$ 2-macroglobulin. *Cell*. 28:3, 643–651 (1982).
- [79] Kim, J. H.; Lingwood, C. A.; Williams, D. B.; Furuya, W.; Manolson, M. F.; Grinstein, S.: Dynamic measurement of the pH of the Golgi complex in living cells using retrograde transport of the verotoxin receptor. *J. Cell Biol.* 134:6, 1387–1399 (1996).
- [80] Wagner, C. A.; Finberg, K. E.; Breton, S.; Marshansky, V.; Brown, D.; Geibel, J. P.: Renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Physiol. Rev.* 84:4, 1263–1314 (2004).
- [81] Feng, Y.; Forgac, M.: Inhibition of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A. *J. Biol. Chem.* 269:18, 13224–13230 (1994).
- [82] Abrahams, J. P.; Leslie, A. G. W.; Lutter, R.; Walker, J. E.: Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*. 370:6491, 621–628 (1994).
- [83] Kane, P. M.: Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* 270:28, 17025–17032 (1995).
- [84] Diakov, T. T.; Kane, P. M.: Regulation of vacuolar proton-translocating ATPase activity and assembly by extracellular pH. *J. Biol. Chem.* 285:31, 23771–23778 (2010).
- [85] Stransky, L. A.; Forgac, M.: Amino acid availability modulates vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly. *J. Biol. Chem.* 290:45, 27360–27369 (2015).
- [86] Voss, M.; Vitavska, O.; Walz, B.; Wiczorek, H.; Baumann, O.: Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 282:46, 33735–33742 (2007).
- [87] Xu, Y.; Parmar, A.; Roux, E.; Balbis, A.; Dumas, V.; Chevalier, S.; Posner, B.: Epidermal growth factor-induced vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase assembly: A role in signaling via mTORC1 activation. *J. Biol. Chem.* 287:31, 26409–26422 (2012).
- [88] MacLeod, K. J.; Vasilyeva, E.; Merdek, K.; Vogel, P. D.; Forgac, M.: Photoaffinity labeling of wild-type and mutant forms of the yeast V-ATPase a subunit by 2-Azido-[32P]ADP. *J. Biol. Chem.* 274:46, 32869–32874 (1999).
- [89] Oot, R. A.; Kane, P. M.; Berry, E. A.; Wilkens, S.: Crystal structure of yeast V<sub>1</sub>-ATPase in the autoinhibited state. *EMBO J.* 35:15, 1694–1706 (2016).

- [90] Couoh-Cardel, S.; Milgrom, E.; Wilkens, S.: Affinity purification and structural features of the yeast vacuolar ATPase Vo membrane sector. *J. Biol. Chem.* 290:46, 27959–27971 (2015).
- [91] Stam, N. J.; Wilkens, S.: Structure of the lipid nanodisc-reconstituted vacuolar ATPase proton channel: Definition of the interaction of rotor and stator and implications for enzyme regulation by reversible dissociation. *J. Biol. Chem.* 292:5, 1749–1761 (2017).
- [92] Smardon, A. M.; Tarsio, M.; Kane, P. M.: The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277:16, 13831–13839 (2002).
- [93] Chan, C. Y.; Parra, K. J.: Yeast phosphofructokinase-1 subunit Pfk2p is necessary for pH homeostasis and glucose-dependent vacuolar ATPase reassembly. *J. Biol. Chem.* 289:28, 19448–19457 (2014).
- [94] Adachi, I.; Arai, H.; Pimental, R.; Forgac, M.: Proteolysis and orientation on reconstitution of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* 265:2, 960–966 (1990).
- [95] Arai, H.; Pink, S.; Forgac, M.: Interaction of anions and ATP with the coated vesicle proton pump. *Biochemistry.* 28:7, 3075–3082 (1989).
- [96] Xu, T.; Forgac, M.: Subunit D (Vma8p) of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase plays a role in coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 275:29, 22075–22081 (2000).
- [97] Procházka, P.; Libra, A.; Zemanová, Z.; Hřebáčková, J.; Poljaková, J.; Hraběta, J.; Bunčec, M.; Stiborová, M.; Eckschlager, T.: Mechanisms of ellipticine-mediated resistance in UKF-NB-4 neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 103:2, 334–341 (2012).
- [98] *Description of REST-384 beta software version 2.* [On-line]. Dostupné z URL: <<https://www.gene-quantification.de/rest-384.html>> [cit. 14. 6. 2021].
- [99] Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W.; Dempfle, L.: Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:9 (2002).
- [100] *Párový t-test – Statistika jednoduše.* [On-line]. Dostupné z URL: <<https://statistikajednoduse.cz/parovy-t-test>> [cit. 14. 6. 2021].
- [101] Sperandio, S.; De Belle, I.; Bredesen, D. E.: An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:26, 14376–14381 (2000).

- [102] Kim, E.; Lee, D. M.; Seo, M. J.; Lee, H. J.; Choi, K. S.: Intracellular Ca<sup>2+</sup> Imbalance Critically Contributes to Paraptosis. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:1 (2021).
- [103] Invitrogen: *PrestoBlue® Cell Viability Reagent*. [On-line]. Dostupné z URL: <<https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf>> [cit. 3. 6. 2021].

