

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Biochemie a patobiochemie



Mgr. Marie Rychlá

Význam V-ATPázy pro chemorezistenci nádorových buněk a potenciace účinku
cytostatik inhibitory V-ATPázy

The role of V-ATPase in chemoresistance of tumor cells and potentiating the
action of cytostatics by inhibitors of V-ATPase

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

V Praze, 12. 09. 2024

Marie Rychlá

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své upřímné poděkování prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc., svému školiteli, za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a trpělivost při vypracování této dizertační práce. Dále děkuji MVDr. Janu Hrabětovi, Ph.D. za objasnění experimentálních přístupů, odborné konzultace a ochotu věnovat mi svůj čas. Děkuji také kolektivu pracovníků laboratoře Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze – Motole za pomoc a vytvoření příjemných pracovních podmínek. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat svému manželovi a rodině za jejich podporu a trpělivost během mého studia.

Abstrakt CZ

Neuroblastom (NBL), maligní embryonální nádor vycházející z periferního nervového systému, představuje nejčastější solidní extrakraniální nádor u dětí. Jeho závažnost a často nepříznivá prognóza podtrhují naléhavou potřebu vývoje nových a účinnějších léčebných strategií v onkologii. Navzdory pokroku v oblasti léčby nádorových onemocnění zůstává léková rezistence významným problémem. Jedním z mechanismů přispívajících k lékové rezistenci je lyzozomální sekvestrace. V tomto procesu se určitá léčiva, zejména slabé báze s hydrofobními vlastnostmi, akumulují v lyzozomech, buněčných organelách s kyselým prostředím udržovaným protonovou pumpou V-ATPázou. Tato sekvestrace brání lékům v dosažení jejich cílů v buňce, čímž je činí neúčinnými. Tato dizertační práce si klade za cíl provést analýzu exprese podjednotek V-ATPázy v buňkách NBL, odhalit případné abnormality a objasnit jejich roli v rozvoji rezistence vůči léčbě ellipticinem a cisplatinou. U buněk NBL rezistentních vůči ellipticinu a cisplatině byla pozorována zvýšená exprese podjednotky ATP6V0D1 V-ATPázy. NBL buňky také vykazovaly zvýšenou lyzozomální kapacitu. Jak inhibice funkce V-ATPázy, tak snížení exprese ATP6V0D1 (knockdown) zvýšily citlivost buněk na ellipticin a cisplatinu. Knockdown ATP6V0D1 dále potlačil proliferaci a migraci, snížil lyzozomální vychytávání a vyvolal zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M. Dále jsme zaznamenali, že ellipticin vyvolával vakuolizaci, která pocházela z endoplasmatického retikula. Snížení exprese ATP6V0D1 tento jev potlačilo. Je pozoruhodné, že inhibice další podjednotky V-ATPázy, ATP6V1H, neměla žádný účinek, což zdůrazňuje specifickou roli ATP6V0D1 v lékové rezistenci. Naše studie rovněž prokázala spojitost mezi zvýšenou expresí ATP6V0D1 a rozvojem rezistence na cisplatinu u pacientů s neuroblastomem. U většiny pacientů léčených vysokými dávkami cisplatiny jsme pozorovali zvýšenou expresi ATP6V0D1, což poukazuje na důležitou roli této podjednotky v mechanismech vzniku chemorezistence. Zdá se tedy, že ATP6V0D1 hraje klíčovou roli v rezistenci neuroblastomu a že V-ATPáza by mohla představovat slibný terapeutický cíl pro překonání tohoto problému.

Klíčová slova: neuroblastom, chemorezistence, V-ATPáza, ATP6V0D1, ellipticin, cisplatina, lyzozomy, lyzozomální sekvestrace léků

Abstrakt EN

Neuroblastoma (NBL) is a malignant embryonic tumor that originates from the peripheral nervous system. It is the most common solid extracranial tumor in children. The severity of neuroblastoma and the often unfavorable prognosis highlight the urgent need for the development of new and more effective cancer treatments. Notwithstanding the advancements that have been made in the field of oncology, the issue of drug resistance remains a significant challenge. One mechanism that contributes to the development of drug resistance is lysosomal sequestration. In this process, specific drugs, particularly weak bases with hydrophobic properties, accumulate in lysosomes, which are cellular organelles with an acidic environment maintained by the V-ATPase proton pump. This process of sequestration prevents the drugs from reaching their intended cellular targets, thereby rendering them ineffective. The objective of this dissertation is to conduct a comprehensive examination of V-ATPase subunit expression in NBL cells, identify potential abnormalities, and elucidate their role in the development of resistance to ellipticine and cisplatin treatment. The ATP6V0D1 V-ATPase subunit was found to be overexpressed in NBL cells that exhibited resistance to ellipticine and cisplatin. Additionally, NBL cells exhibited augmented lysosomal capacity. Both total inhibition and reduction of ATP6V0D1 expression (knockdown) were observed to increase the sensitivity of cells to ellipticine and cisplatin. The knockdown of ATP6V0D1 resulted in additional suppression of proliferation and migration, a reduction in lysosomal uptake, and the induction of cell cycle arrest at the G2/M phase. Additionally, we observed that ellipticine induced vacuolization originating from the endoplasmic reticulum. The suppression of this phenomenon was observed following the knockdown of ATP6V0D1 expression. It is noteworthy that the inhibition of another V-ATPase subunit, ATP6V1H, had no effect, which serves to highlight a specific role for ATP6V0D1 in drug resistance. This study also identified a correlation between increased ATP6V0D1 expression and the development of cisplatin resistance in neuroblastoma patients. Elevated ATP6V0D1 expression was observed in the majority of patients treated with high-dose cisplatin, implicating this subunit in chemoresistance mechanisms. These findings suggest that ATP6V0D1 plays a key role in neuroblastoma resistance to cisplatin and that V-ATPase may be a promising therapeutic target to overcome this challenge.

Key words: neuroblastoma, chemoresistance, V-ATPase, ATP6V0D1, ellipticine, cisplatin, lysosomes, lysosomal sequestration

Seznam zkratek

3CLpro	z angl. 3 C-like proteinase
ADP	adenosindifosfát
ALK	z angl. anaplastic lymphoma kinase
APS	amonium peroxodisulfát
ASCT	z angl. autologus stem cell transplantation
ATP	adenosintrifosfát
ATP6V0D1	d podjednotka V-ATPázy
ATP6V1H	H podjednotka V-ATPázy
BAF	bafilomycin A
BAPTA- AM	1,2-bis (2-aminofenoxy) ethan-N, N,N', N'-tetraoctová kyselina terakis (acetoxymethylester)
BARD1	BRCA1-asociovaná RING doména 1
BCL2	onkogen z angl. B-cell lymphoma-2
BF	z angl. bright-field
BRCA1,2	z angl. breast cancer gene 1, 2
BSA	bovinní sérový albumin
CA-IX	z angl. carbonic anhydrase IX
CD	cisplatina
CDDP	cisplatina
cDNA	z angl. complementary DNA
CLEAR	z angl. coordinated lysosomal expression and regulation
COG	z angl. Children's Oncology Group
COJEC	léčebný protokol cisplatina (C), vinkristin (O), karboplatina (J), etoposid (E) a cyklofosfamid (C)
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	z angl. epidermal growth factor receptor
ELLI	ellipticin

ER	endoplazmatické retikulum
ERK	z angl. extracellular signal regulated kinase
ETR	ER Tracker
FBS	fetální bovinní sérum
HBSS	z angl. Hanks' balanced salt solution
HER2	z angl. human epidermal growth factor receptor 2
HR-NBL	z angl. high- risk neuroblastoma
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50% úmrtnost buněk
IDRF	z angl. imaging-defined risk factors
IMDM	z angl. Iscove's Modified Dulbeccos Medium
INSS	z angl. Internation Neuroblastoma Staging System
INRGSS	z angl. Internation Neuroblastoma Risk Group Staging System
KIF1B	z angl. Kinesin Family Member 1B
LAMP-1, -2, -3	z angl. lysosome-associated membrane protein-1, -2, -3
LIMP-2	z angl. lysosomal integral membrane protein-2
LTR	Lysotracker
MAPK	z angl. mitogen-activated protein kinase
MCT	monokarboxylátový transportér
MDR	z angl. multidrug resistance
MIBG	metajodobenzylguanidin
MLH1	z angl. MutL protein homolog 1
MG-132	ihibitor proteazomu
MPP+	1-methyl-4-fenylpyridin
mRNA	z angl. messenger RNA
MT	metalothioneniny
MTIF	mitochondriální iniciační translační faktor
mTOR	z angl. mammalian target of Rapamicyn
mTORC1	z angl. mammalian target of Rapamycin Complex 1
MTR	MitoTracker

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid
MYC	protoonkogen
MYCN	protonkogen exprimovaný v neurální tkáni
NBL	neuroblastom
NEF	z angl. negative replication factor
NHE1	z angl. Na ⁺ /H ⁺ exchanger 1
NHR	z angl. nonhomologous region
Obr.	obrázek
p53	tumorsupresorový protein
PBS	z angl. phosphate-buffered saline
pH	záporný logaritmus koncentrace H ⁺ iontů
PERK	z angl. protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PHOX2B	z angl. Paired-like homobox 2b
PI3K	fosfatidylinositol 3 kináza
PKA	proteinkináza A
pPERK	z angl. pospho-PERK
PVDF	polyvinylidendifluorid
RAS	protoonkogen
RAVE	z angl. regulator of H ⁺ - ATPase of vacuolar and endosomal membranes
RB1	retinoblastomový protein 1
RIPA	z angl. Radioimmunoprecipitation assay buffer
RISC	z angl. RNA-induced silencing complex
RNA	řibonukleová kyselina
ROS	z angl. reactive oxygen species
qRT-PCR	z angl. quantitative real time polymerase chain reaction
SARS	z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome
SDS	dodecylsulfát sodný

SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
siRNA	z angl. small interfering RNA
SNP	z angl. single nucleotide polymorphism
SLC	z angl. solute carrier proteins
Tab.	tabulka
TBS	z angl. tris-buffered saline
TBST	z angl. Tris-buffered saline with Tween [®] 20 detergent
TEMED	1,2,-bis (dimethylamino) ethan
TFE3	transkripční faktor E3
TFEB	transkripční faktor EB
TP53	tumorsupresorový gen
Tris	1,1,1-tris (hydroxymethyl) aminomethan
TUNICA	tunicamycin
TWEEN 20	polyxyethylensorbitanmonolaurát
UPR	z angl. unfolded protein response
V-ATPáza	vakuolární ATPáza, též H ⁺ -ATPáza
Wnt	z angl. z angl. wingless-related integration site

Obsah

1	Teoretický úvod a literární přehled	13
1.1	Karcinogeneze a charakteristika nádorových buněk.....	13
1.2	Nádorová onemocnění dětského věku	16
1.2.1	Neuroblastom	17
1.2.2	Léčba neuroblastomu.....	19
1.2.3	Cisplatina.....	20
1.2.4	Ellipticin	21
1.3	Chemorezistence	22
1.3.1	Lyzozomy a nádorová onemocnění.....	24
1.4	V-ATPáza	26
1.4.1	Funkce a struktura V-ATPázy	26
1.4.2	Regulace a patologie V-ATPázy	30
2	Cíle dizertační práce	32
3	Materiál a chemikálie	33
4	Experimentální metody.....	35
4.1	Kultivace buněčných linií	35
4.2	Příprava buněk pro experimenty	35
4.3	Stanovení viability buněk	36
4.3.1	MTT test	36
4.3.2	PrestoBlue assay	37
4.4	Transfekce buněk.....	37
4.5	Stanovení exprese mRNA.....	38
4.5.1	Izolace RNA z neuroblastomových buněčných linií	38
4.5.2	Izolace RNA ze vzorků nádorů	39
4.5.3	Reverzní transkripce	40

4.5.4	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR)	40
4.6	Stanovení exprese proteinů pomocí metody Western blot	41
4.6.1	Izolace proteinů	41
4.6.2	Stanovení koncentrace proteinů dle Lowryho	42
4.6.3	Elektroforetická separace proteinů (SDS-PAGE).....	42
4.6.4	Western blot.....	43
4.7	Stanovení exprese proteinů pomocí průtokové cytometrie.....	43
4.8	Stanovení proliferace buněk pomocí systému xCelligence	44
4.9	Analýza migrace buněk metodou “wound-healing assay”	45
4.10	Analýza buněčného cyklu	45
4.11	Sledování vstupu lyzozomálního barviva	45
4.12	Konfokální mikroskopie.....	46
4.13	Statistické vyhodnocení.....	46
5	Výsledky	47
5.1	ATP6V0D1 podjednotka V-ATPázy vykazuje zvýšenou expresi u NBL linií rezistentních vůči cisplatině UKF-NB-4 ^{CDDP} a ellipticinu UKF-NB-4 ^{ELLI}	47
5.2	Rezistentní neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 ^{ELLI} a UKF-NB-4 ^{CDDP} vykazují vyšší lyzozomální absorpci a inhibice V-ATPázy potencuje účinky testovaných cytostatik	50
5.3	Zavedení a ověření úspěšnosti transfekce siRNA proti ATP6V0D1 a ATP6V1H.....	53
5.4	Umlčení ATP6V0D1 podjednotky V-ATPázy potencuje cytotoxicitu testovaných cytostatik a inhibuje proliferaci neuroblastomových buněčných linií.....	55
5.5	Umlčení ATP6V0D1 podjednotky V-ATPázy inhibuje buněčnou migraci a vede k zástavě buněčného cyklu	59
5.6	Průkaz exprese ATP6V0D1 ve vzorcích nádorů	61
5.7	Umlčení ATP6V0D1 podjednotky V-ATPázy snížilo ellipticinem indukovanou tvorbu vakuol v buněčných liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4 ^{ELLI}	63

5.8	Zjištění původu ellipticinem indukovaných vakuol v liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4 ^{ELLI}	66
5.9	UPR dráha se nepodílí na ellipticinem indukované vakuolizaci	68
5.10	Vápník a ellipticinem indukovaná vakuolizace	71
6	Diskuze	74
7	Závěr	77
8	Souhrn	79
9	Summary	80
10	Seznam publikací autora	81
11	Seznam použité literatury	83

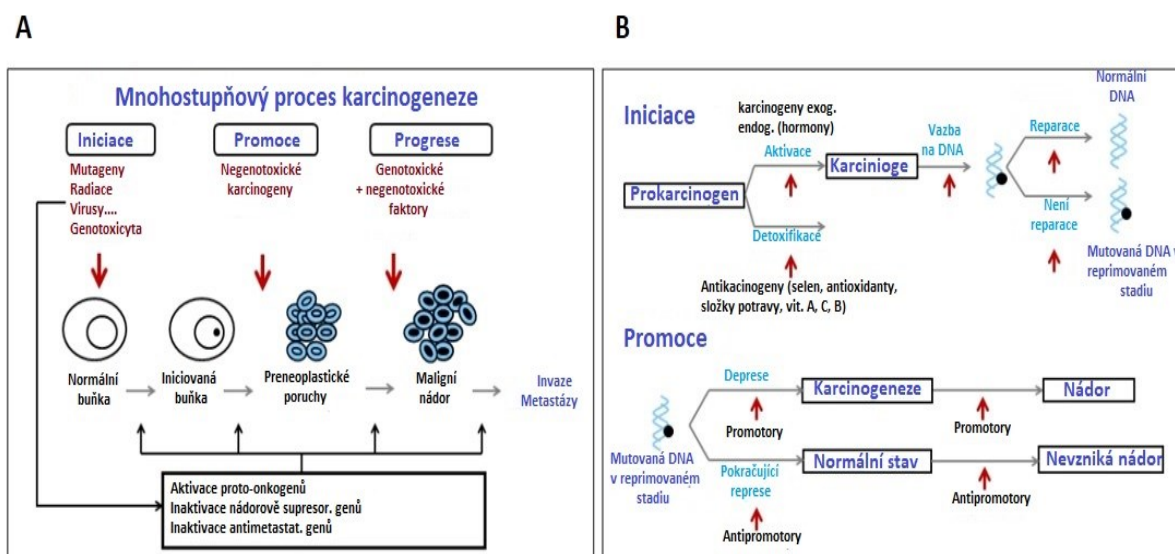
1 Teoretický úvod a literární přehled

Zhoubné nádory patří mezi nejzávažnější problémy moderní medicíny (Ferlay et al. 2019). Česká republika se v Evropě řadí mezi země s vyšším výskytem nádorů, u některých typů nádorových onemocnění dokonce zaujímáme přední příčky v evropských statistikách. V roce 2021 bylo v ČR nově diagnostikováno 82 395 případů onkologických onemocnění, tedy 784,7 na 100 000 osob. Incidence těchto onemocnění je dlouhodobě lehce vyšší u mužů než u žen, poměr zastoupení mužů a žen v roce 2021 byl 1,1 : 1. Zhoubné novotvary jsou stále druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR po kardiovaskulárních chorobách (Krejčí et al. 2021). Nádory vznikají v důsledku složitých procesů, při kterých dochází k nekontrolovanému růstu a dělení buněk, což může vést k poškození okolních tkání a orgánů (Hanahan a Weinberg 2011). Přestože moderní medicína disponuje širokou škálou diagnostických a terapeutických nástrojů, léčba nádorových onemocnění zůstává často náročná a ne vždy úspěšná (Siegel et al. 2020). Proto je výzkum v oblasti onkologie klíčový pro vývoj nových a účinnějších léčebných postupů, které by mohly zlepšit prognózu pacientů a zvýšit jejich kvalitu života.

1.1 Karcinogeneze a charakteristika nádorových buněk

Karcinogeneze, proces vzniku a vývoje nádorového onemocnění, je komplexní, mnohostupňový a dynamický proces, který může trvat i mnoho let (Baba a Côté 2007). Pokud jsou buňky vystaveny stresovým faktorům, aktivují své reparační mechanismy, aby se pokusily přizpůsobit nepříznivým podmínkám a napravit vzniklé poškození (Chatterjee a Walker 2017). Pokud je poškození DNA příliš rozsáhlé nebo se nahromadí velké množství defektů, které nelze opravit, spustí se v buňce proces programované buněčné smrti, tzv. apoptóza. Tímto způsobem se organismus chrání před potenciálně nebezpečnými buňkami s poškozenou DNA (Pistritto et al. 2016; Elmore 2007). Dalším důležitým mechanismem, který buňky využívají k zvládnutí stresu, je autofagie. Během autofagie dochází k řízenému rozkladu a recyklaci buněčných komponent, včetně nesprávně poskládaných proteinů a poškozených organel. Tento proces pomáhá udržovat buněčnou homeostázu a chrání buňku před negativními důsledky stresu (Yang a Klionsky 2009; Hughes a Rusten 2013; Feng et al. 2013). Kromě apoptózy a autofagie může stres také ovlivnit buněčný cyklus. Buňky mohou dočasně zastavit svůj cyklus, aby měly čas na opravu poškození, nebo mohou vstoupit do senescence, což je stav trvalého zastavení

buněčného dělení (Huang et al. 2022; Kumari a Jat 2021). Karcinogeneze je výsledkem postupné akumulace genetických a epigenetických změn v buňce, které narušují základní buněčné mechanismy regulující proliferaci, diferenciaci, apoptózu a interakce s okolním mikroprostředím. Toto narušení umožňuje nádorovým buňkám unikat kontrolním mechanismům organismu a nekontrolovatelně růst a šířit se. Vývoj karcinogeneze lze rozdělit do tří fází- iniciace, promoce a progresu (**Obr. 1.1**). V jednotlivých fázích tohoto procesu mohou hrát roli různé faktory, jako je genetická predispozice, expozice karcinogenům, stav imunitního systému a další (Hofmanová 2013; Baba a Côté 2007; Hanahan a Weinberg 2011).

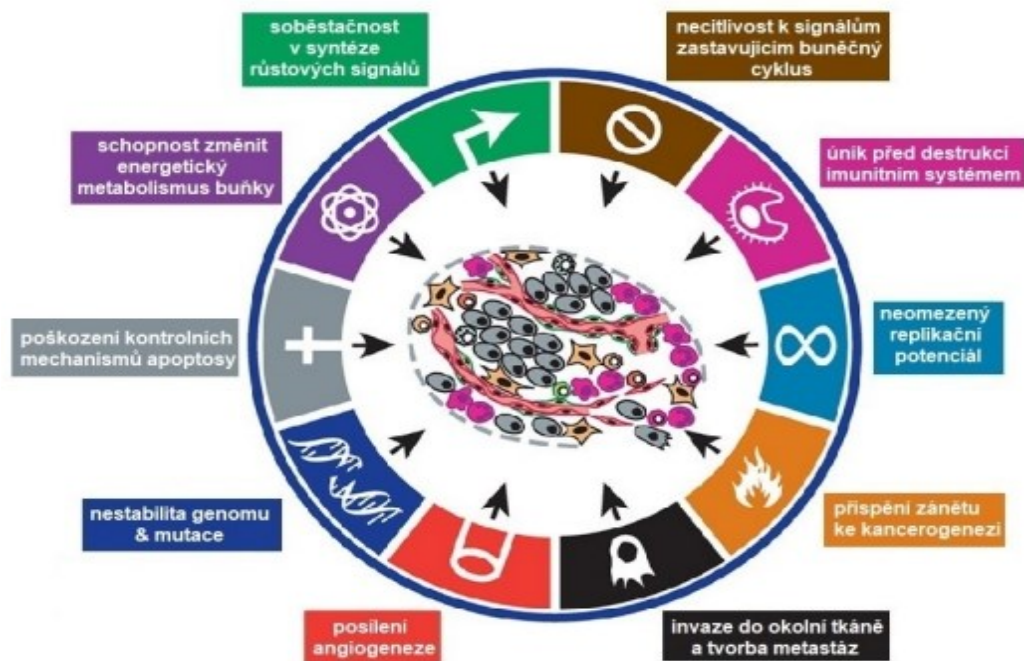


Obr. 1.1: Fáze karcinogeneze. Mnohostupňový proces karcinogeneze a faktory, které ho ovlivňují (A). Iniciace a promoce (B). Prevzato z (Hofmanová 2013).

Na molekulární úrovni je karcinogeneze charakterizována alteracemi v genech, které kódují proteiny důležité pro kontrolu buněčného cyklu, opravu DNA, apoptózu a buněčnou signalizaci. Mezi tyto geny patří onkogeny, jejichž aktivace (např. mutacemi, amplifikací nebo translokací) vede k nadměrné expresi nebo aktivaci proteinů podporujících buněčný růst a proliferaci. Příklady onkogenů zahrnují *RAS*, *MYC*, *HER2*, *EGFR* a *BCL2*. Tumor supresorové geny jejichž inaktivace (např. mutacemi nebo delecí) vede ke ztrátě funkce proteinů, které normálně brzdí buněčný růst a podporují apoptózu. Mezi významné tumor supresorové geny patří *TP53*, *RBI*. Geny regulující opravu DNA, kdy mutace v těchto genech vedou k akumulaci dalších genetických změn a zvyšují genomovou nestabilitu, což podporuje vznik nádoru.

Příkladem jsou geny *BRCA1*, *BRCA2* a *MLH1* (Alberts et al. 2002). Kromě genetických změn hrají v karcinogenezi významnou roli také epigenetické změny, jako jsou metylace DNA a modifikace histonů. Tyto změny mohou ovlivňovat expresi genů bez změny sekvence DNA a přispívat k rozvoji nádorového fenotypu (Belhajova et al. 2022; Dawson a Kouzarides 2012; Greer a Shi 2012; Hoffmann et al. 2012).

Na buněčné úrovni se karcinogeneze projevuje řadou charakteristických znaků (**Obr. 1.2**), známých jako "hallmarks of cancer" (znaky nádorového bujení). Mezi tyto znaky patří: nekontrolovaná proliferace, při níž nádorové buňky ignorují signály regulující normální buněčný růst a dělení, což vede k jejich neomezenému množení. Ztráta diferenciace neboli schopnosti specializace, vede k tomu, že buňky přestávají plnit své normální funkce. Nádorové buňky získávají schopnost invaze, tedy pronikání do okolních tkání a šířit se do vzdálených orgánů (metastazovat). Dalším charakteristickým znakem nádorových buněk je rezistence vůči apoptóze, tedy schopnost vyhnout se programované buněčné smrti, která umožňuje nádorovým buňkám přežít a nekontrolovaně se množit i za podmínek, které by za normálních okolností vedly k jejich zániku. Pro zajištění dostatečného přísunu živin a kyslíku potřebných pro svůj růst a šíření mohou nádorové buňky stimulovat tvorbu nových krevních cév, což je proces známý jako angiogeneze. Mezi další znaky nádorového bujení patří například změny metabolismu, únik imunitnímu systému a zánětlivé mikroprostředí (Hanahan a Weinberg 2011). Pochopení těchto mechanismů je zásadní pro vývoj nových a účinnějších strategií pro prevenci, diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění.



Obr. 1.2: Charakteristické rysy nádorových buněk, převzato a upraveno z (Hanahan a Weinberg 2011).

1.2 Nádorová onemocnění dětského věku

Nádorová onemocnění dětského věku, ačkoli představují relativně malou část všech onkologických onemocnění, mají zásadní dopad na životy dětí a jejich rodin. V České republice je každoročně incidence nádorových onemocnění u dětí do 15 let věku 130-140 případů na milion dětí (www.uzis.cz). I přes tuto relativně nízkou incidenci jsou malignity druhou nejčastější příčinou úmrtí v této věkové skupině, hned po úrazech. Dětské a dospělé malignity se liší v mnoha aspektech, kdy většina dětských nádorů nemá jasnou příčinu a je spojována s genetickými mutacemi, které vznikají během vývoje plodu nebo v raném dětství. Rizikové faktory prostředí nebo životního stylu hrají u dětských nádorů menší roli, zatímco u dospělých jsou nádory často spojeny s dlouhodobou expozicí rizikovým faktorům, jako je kouření, nezdravá strava, nadměrná konzumace alkoholu, nedostatek pohybu, obezita, infekce nebo vystavení určitým chemikáliím či záření. Mezi nejčastější typy nádorů u dětí patří leukémie (zejména akutní lymfoblastická leukémie), nádory mozku, neuroblastom, lymfomy, nádory

ledvin (Wilmsův tumor), nádory kostí (osteosarkom, Ewingův sarkom) a další. V posledních desetiletích došlo k výraznému zlepšení prognózy dětí s nádorovými onemocněními, a to díky pokrokům v diagnostice a léčbě (Vyzula et al. 2018; Adam et al. 2010). V současnosti přežívá více než 85 % dětí se zhoubnými nádory alespoň pět let od stanovení diagnózy. Přesto však zůstávají některé typy nádorů, zejména ty s vysokým rizikem, velkou výzvou a vyžadují další výzkum a vývoj nových léčebných postupů (Krejci et al. 2020).

1.2.1 Neuroblastom

Neuroblastom (NBL) je embryonální maligní nádor z buněk sympatiku, tedy části autonomního nervového systému. Jedná se o nejčastější extrakraniální solidní tumor u dětí, přičemž většina případů je diagnostikována před dosažením 5. roku (Tsubota a Kadomatsu 2018; Qiu a Matthay 2022). Přesná příčina vzniku NBL zůstává do značné míry neznámá. U malého procenta pacientů s NBL byly identifikovány germinální mutace v genech *ALK*, *PHOX2B* a *KIF1B*, které zvyšují riziko vzniku NBL (Mossé et al. 2008; Trochet et al. 2004; Janoueix-Lerosey et al. 2008; Yang et al. 2001). Studie ukázaly, že alely s jednonukleotidovým polymorfismem (SNP) v rámci předpokládaných genů FLJ22536 na chromozomovém pásu 6p22.3 a BARD1 (BRCA1-asociovaná RING doména 1) na 2q35 jsou významně častější u pacientů s NBL ve srovnání s kontrolní skupinou (Maris et al. 2008; Capasso et al. 2009). Většina NBL vykazuje somatické mutace, které vznikají během vývoje plodu nebo v raném dětství a nejsou dědičné. Tyto abnormality jsou často spojeny s agresivnějším průběhem onemocnění. Amplifikace onkogenu *MYCN*, lokalizovaném na chromozomu 2 (2p24), je spojena s nepříznivou prognózou u pacientů s NBL a vyšetření počtu kopií genu *MYCN* je proto standardní součástí diagnostického postupu. *MYCN* patří do rodiny transkripčních faktorů MYC, které regulují buněčnou proliferaci, diferenciaci a přežití (Cheung a Dyer 2013; Maris 2010). Delece chromozomálních oblastí 1p, 3p, 11q, 4p, 9p a 14q, stejně jako zisk oblastí 1q, 2p a 17q, jsou dalšími častými genetickými změnami pozorovanými u NBL (Vandesompele et al. 1998; Paolini et al. 2022; Attiyeh et al. 2005; Fong et al. 1989). V rámci laboratorní diagnostiky NBL se provádí vyšetření aspirátu kostní dřeně k průkazu infiltrace nádorovými buňkami, krevního obrazu a biochemických parametrů v plazmě. NBL produkuje nadměrné množství katecholaminů (adrenalin, noradrenalin a dopamin), které jsou následně metabolizovány a jejich metabolity (kyselina vanilmandlová, kyselina homovanilová,

metanefrin a normetanefrin) lze detekovat v moči a využít je k diagnostice a monitorování (LaBrosse et al. 1976).

NBL je charakterizován heterogenním chováním, což znamená, že jeho průběh a prognóza mohou být velmi různorodé a dělí se do tří hlavních rizikových skupin: nízkého, středního a vysokého rizika. Do rizikových skupin je klasifikace prováděna na základě kombinace faktorů, včetně věku při diagnóze, rozsahu onemocnění, histologických nálezů a cytogenetických charakteristik, jako je amplifikace *MYCN* a ploidie DNA (DuBois et al. 2022). Pro přesnější stanovení prognózy a volbu vhodné léčby bylo vyvinuto několik systémů klasifikace do rizikových skupin. International Neuroblastoma Staging System (INSS) je založen na výsledcích chirurgického zákroku, rozsahu nádoru, počtu kopií *MYCN* a histopatologickém vyšetření nádoru. Tento systém klasifikuje NBL do čtyř hlavních stádií (1, 2, 3, 4) a jednoho speciálního stádia 4S, přičemž každé stadium reflektuje rozsah nádoru a jeho šíření. V posledních letech je postupně nahrazován novějším systémem INRGSS (z angl. International Neuroblastoma Risk Group Staging System), který je založen na předoperačních zobrazovacích vyšetřeních a dalších klinických, histopatologických a molekulárně genetických parametrech, klasifikuje neuroblastom do stádií L1, L2, M, MS a 4 rizikových skupin (velmi nízké, nízké, střední a vysoké riziko). Tato klasifikace umožňuje lépe přizpůsobit léčbu individuálním potřebám pacienta a zlepšit tak jeho prognózu. (**Tab. 1.1**) (Brodeur 2018; Krystal a Foster 2023; Irwin et al. 2021). Přibližně polovina pacientů je postižena NBL vysokého rizika (HR-NBL z angl. high-risk neuroblastoma).

Tab. 1.1: International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS). Tento systém využívá sadu zobrazovacích rizikových faktorů (imaging-defined risk factors, IDRF) k rozlišení nemetastatických nádorů na L1 (bez IDRF) a L2 (s IDRF). Pacienti s metastatickým onemocněním jsou klasifikováni jako stadium M, s výjimkou dětí mladších 18 měsíců metastázami omezenými na kůži, játra a/nebo kostní dřev (stadium MS). GN (ganglioneurom), GNB (ganglioneuroblastom) Amp (amplifikace), NA (neamplifikovaný). Tato klasifikace, převzatá z (Cohn et al. 2009), je součástí léčebných protokolů pro neuroblastom.

INRG Stage	Age (months)	Histologic Category	Grade of Tumor Differentiation	MYCN	11q Aberration	Ploidy	Pretreatment Risk Group
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed					A Very low
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA			B Very low
				Amp			K High
L2	< 18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low
					Yes		G Intermediate
			Differentiating	NA	No		E Low
					Yes		
	≥ 18	GNB nodular; neuroblastoma	Poorly differentiated or undifferentiated	NA			H Intermediate
				Amp			N High
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F Low
	< 12			NA		Diploid	I Intermediate
	12 to < 18			NA		Diploid	J Intermediate
	< 18			Amp			O High
	≥ 18						P High
MS					No		C Very low
				NA	Yes		Q High
	< 18			Amp			R High

1.2.2 Léčba neuroblastomu

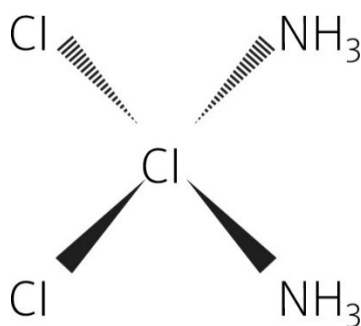
Protinádorová léčba (také nazývaná onkologická léčba) je soubor různých přístupů a metod, jejichž cílem je zničit nádorové buňky nebo potlačit jejich růst a tím dosáhnout vyléčení pacienta, prodloužení jeho života nebo zmírnění příznaků onemocnění, a to vše s co nejmenším dopadem nežádoucích účinků (Klener a Klener 2010). Léčba NBL je stratifikovaná dle stupně rizika a probíhá v České republice ve 2 specializovaných centrech-Klinika dětské hematologie a onkologie FN Motol v Praze a Klinika dětské onkologie FN Brno (Mazánek 2016). U pacientů velmi nízkého a nízkého rizika se obvykle volí pozorování nebo chirurgická

léčba, případně minimální chemoterapie. U pacientů se středním rizikem je léčba založena na kombinaci operace a méně intenzivní chemoterapie. Léčba pacientů s vysokým rizikem neuroblastomu (HR-NBL) je intenzivní a zahrnuje multimodální přístup. Začíná se indukční chemoterapií, po níž následuje operace, vysokodávkovaná chemoterapie s transplantací kmenových buněk, radioterapie, imunoterapie a udržovací léčba. Součástí imunoterapie jsou také specifické anti-GD2 protilátky, které mohou přímo navodit smrt reziduálních nádorových buněk (Krystal a Foster 2023). Indukční režimy chemoterapie u NBL s vysokým rizikem obvykle zahrnují 5 až 8 cyklů intenzivní léčby, využívající kombinaci alkylačních látek, sloučenin platiny a inhibitorů topoizomerázy. Současné studie COG (z angl. Children's Oncology Group) aplikují 5 cyklů s topotekanem, vinkristinem, doxorubicinem, cyklofosfamidem, cisplatinou a etoposidem (NCT03126916). V Evropě je stále standardním indukčním režimem rychlý protokol COJEC, který poskytuje 8 cyklů komprimované chemoterapie s kombinacemi vinkristinu, karboplatiny, etoposidu, cyklofosfamidu a cisplatin. Studie porovnávající rychlý COJEC s nekomprimovanou indukční terapií neprokázaly významné rozdíly ve výsledcích (Peinemann et al. 2016). Příprava pacientů na autologní transplantaci kmenových buněk (ASCT) zahrnuje odběr kmenových buněk během indukční fáze. Mnoho pacientů s HR-NBL má při diagnóze již metastázy v kostní dřeni a mohou mít reziduální onemocnění i v době odběru. Odebrané kmenové buňky mohou být čištěny pro odstranění případných nádorových buněk, ale studie COG neprokázala zlepšení přežití po použití čištěných buněk oproti nečištěným (Kreissman et al. 2013). Proto je standardní praxí používat nečištěné buňky. Při odběru je zásadní získat dostatečné množství buněk pro ASCT i pro potenciální budoucí terapie, jako je terapie I^{131} MIBG (metajodbenzylguanidin). MIBG je selektivně vychytáván neuroblastomovými buňkami a izotop jód-131 následně emituje beta záření, které má krátký dosah a způsobuje poškození DNA a buněčnou smrt v blízkosti místa svého rozpadu (Kreissman et al. 2013).

1.2.3 Cisplatina

Cis-diammindichloroplatnatý komplex neboli cisplatina (**Obr. 1.3**) je účinná, ale zároveň toxická látka používaná v chemoterapii k léčbě různých nádorů (varlat, vaječníků, plic, močového měchýře) a je důležitým cytostatikem při léčbě HR-NBL. Patří do skupiny tzv. platinových cytostatik, které se vyznačují svou schopností vázat se na DNA a vytvářet

intrařetězcové (po vazbě na dva guaniny v komplementárních řetězcích) a interřetězcové (po vazbě na dva sousední guaniny nebo na guanin a adenin) zesíťování, což narušuje procesy replikace a transkripce. Poškození DNA aktivuje signální dráhy vedoucí k apoptóze nádorových buněk. Kromě DNA může cisplatina interagovat i s dalšími buněčnými složkami, což přispívá k jejímu cytotoxickému účinku. Má afinitu k sulfhydrylovým skupinám na proteinech, což může ovlivnit jejich funkci a stabilitu. Je schopna vázat se na fosfolipidy a měnit jejich uspořádání v membráně, což mění jejich permeabilitu. Dále také ovlivňuje cytoskelet buňky. Cisplatina může poškodit mitochondrie, což vede k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a narušení energetického metabolismu buňky (Tchounwou et al. 2021; Sosa et al. 2013; Speelmans et al. 1997).

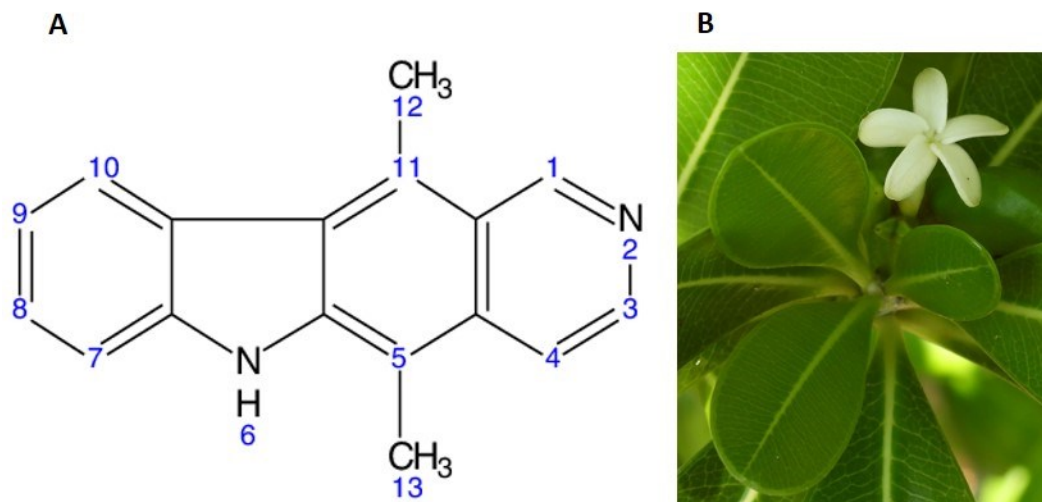


Obr. 1.3: Struktura cisplatiny. Cisplatina se aktivuje po svém vstupu do cytoplazmy vytěsněním atomů chloru molekulami vody za vzniku elektrofilu s afinitou k sulfhydrylovým skupinám na proteinech a donorovým atomům dusíku na nukleových kyselinách (Tchounwou et al. 2021). Převzato z (Karbownik et al. 2012).

1.2.4 Ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b] karbazol) je přírodní alkaloid izolovaný z rostliny *Ochrosia elliptica*, vykazující protinádorovou aktivitu proti různým typům nádorů, včetně leukémií, lymfomů, karcinomu prsu, plic a vaječníků. I přesto, že není používán v klinické praxi je v současné době ellipticin a jeho deriváty předmětem intenzivního výzkumu jako potenciální protinádorové léčivo také díky poměrně omezeným toxickým vedlejším účinkům a absenci hematologické toxicity. Jedná se o látku s multimodálním mechanismem účinku. Dominantní je jeho schopnost interkalace do DNA, kdy se díky své planární struktuře

(Obr. 1.4) dokáže vmezeřit (interkalovat) mezi báze DNA, což narušuje její strukturu a stabilitu. Dále inhibuje aktivitu topoizomerázy II, což vede k akumulaci dvouřetězcových zlomů DNA a následné buněčné smrti. Má potenciál inhibovat fosforylaci mutantního p53, což může vést k jeho degradaci a obnovení jeho tumor supresorové funkce. Ellipticin dokáže také působit jako alkylační činidlo, kdy svojí kovalentní vázbou na DNA tvoří addukty (Dan et al. 2019; Harding a Grummitt 2005; Kuskucu et al. 2020).



Obr. 1.4: Struktura ellipticinu. Ellipticin, díky své planární tetracycké struktuře (A), snadno interaguje s hydrofobními částmi DNA. Jeho methylové skupiny specificky interagují s thyminovými bázemi DNA. Po aktivaci enzymy cytochromu P450 (CYP) dochází k oxidaci ellipticinu, což mu umožňuje kovalentně se vázat na DNA a vytvářet takzvané DNA adukty. Ellipticin, díky své unikátní struktuře, vykazuje charakteristické absorpční pásy v ultrafialové a viditelné oblasti spektra, což umožňuje jeho přesné stanovení pomocí spektrofotometrie. Navíc má i fluorescenční vlastnosti, které jsou velmi užitečné pro jeho detekci a studium (Banerjee et al. 2011; Stiborová et al. 2006). *Ochrosia elliptica*, rostlina, ze které byl ellipticin izolovaný (B). Převzato z (Stiborová et al. 2006).

1.3 Chemorezistence

Je však známo, že protinádorová léčba může vyvolat rezistenci, která je spojena se zvýšenou agresivitou nádorových buněk a progresí onemocnění. Rezistence na

chemoterapeutika a cílená léčiva je jednou z hlavních překážek v úspěšné léčbě nádorů. Byly identifikovány různé mechanismy, které přispívají k lékové rezistenci (Zheng 2017). Rezistence může být buď vnitřní (primární), když je nádorová buňka od počátku rezistentní vůči určitému cytostatiku, nebo získaná (sekundární), která se vyvine během léčby. Jako mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR) označujeme schopnost nádorových buněk odolávat více různým protinádorovým lékům, které se zásadně liší svou chemickou strukturou a mechanismem účinku. Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují vývoj sekundární rezistence, jako jsou genetické změny v nádorových buňkách, rychlost růstu nádoru, ale také vlivy mikroprostředí, např. hypoxie, která prokazatelně vyvolává chemo- a radiorezistenci (Merlos Rodrigo et al. 2020). V posledních desetiletích se intenzivně zkoumají mechanismy rezistence, z nichž nejznámější jsou: (i) zvýšený eflux léčiva z nádorových buněk nebo snížený vstup léčiva; (ii) downregulace, nadměrná exprese nebo modifikace cílové molekuly (molekul); (iii) změny v enzymech aktivujících a/nebo detoxikujících léky; (iv) indukce antiapoptotických mechanismů nebo inaktivace proapoptotických mechanismů; (v) snížený přístup léčiva do cílových buněčných kompartmentů (obvykle do jádra); (vi) změna buněčného cyklu (většina buněk se přesune do fáze G0, ve které je citlivost na většinu cytostatik nízká); (vii) farmakologické a fyziologické faktory, jako jsou změny v metabolismu a vylučování léčiva a nedostatečný přístup léčiva k nádoru včetně hematoencefalické bariéry u mozkových nádorů; a (viii) také mikroprostředí hraje roli v chemorezistenci produkcí stimulačních faktorů, které indukují dráhy přežití a také mohou inaktivovat léky (Zheng 2017; Merlos Rodrigo et al. 2020; Skarkova et al. 2019; Gong et al. 2019). Řada studií navíc odhalila význam metalothioneinů (MT) pro obranné mechanismy nádorových buněk proti účinku chemoterapie prevencí apoptózy (Merlos Rodrigo et al. 2020). Mnoho experimentálních studií a klinická praxe ukazují, že nádorové buňky využívají kombinaci různých mechanismů k dosažení rezistence vůči lékům a překonání tohoto problému bude vyžadovat komplexní přístup. Pro pacienty s nádory je nezbytné, aby dostávali cílenou, individualizovanou a kombinovanou terapii v adekvátních dávkách a intervalech. Tato strategie zvyšuje terapeutickou účinnost, snižuje riziko sekundární rezistence a snižuje tkáňovou toxicitu (Skarkova et al. 2019; Gong et al. 2019).

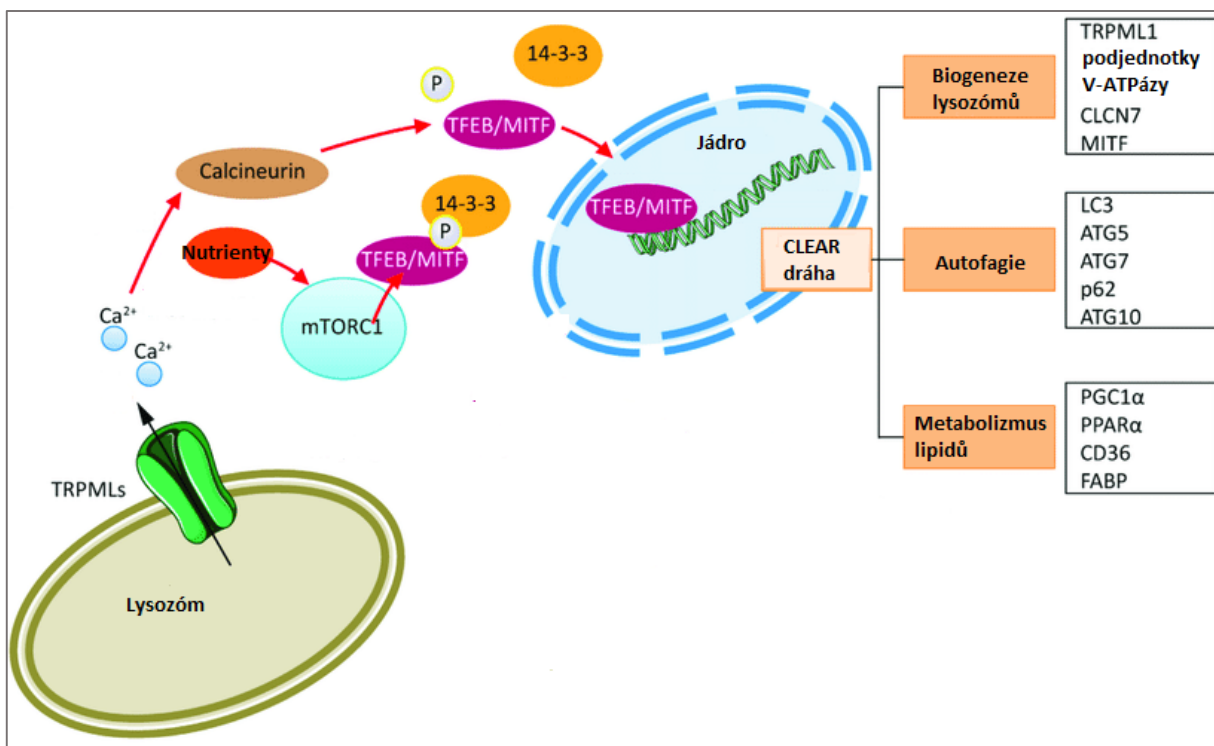
Bylo prokázáno, že lyzozomy zachycují určitá hydrofobní slabě bazická chemoterapeutika, jako např. antracykliny, imidazoakridinony (nové protinádorové sloučeniny, které inhibují topoizomerázu II a interkalují do DNA), stejně jako některé inhibitory

tyrosinkinázy, čímž jsou sekvestrovány mimo jejich intracelulární cílové místo (Zhitomirsky a Assaraf 2016; 2017).

1.3.1 Lyzozomy a nádorová onemocnění

Lyzozomy jsou nitrobuněčné organely s kyselým prostředím ($\text{pH} \leq 5$), které obsahují kyselé hydrolázy a specifické membránové proteiny. Mezi nejvýznamnější patří lyzozomální integrální membránový protein (LIMP)-2, lyzozomální membránový protein (LAMP) -1, -2, -3 a vakuolární typ H^+ -ATPázy (V-ATPáza). Lyzozomy se nacházejí ve všech eukaryotických buňkách, ale jejich tvar, velikost a počet se liší v závislosti na typu buňky a jejím aktuálním stavu (Appelqvist et al. 2013). Morfologicky se jeví jako tělíska v cytozolu, obvykle o průměru 0,1-2 μm , obklopená jednoduchou fosfolipidovou dvojvrstvou (Saftig et al. 2010). Lyzozomy jsou nepostradatelné organely eukaryotických buněk, které fungují jako jejich recyklační a trávicí centra. Uvnitř těchto membránových váčků se nachází celá řada enzymů schopných rozkládat širokou škálu biomolekul, od proteinů a nukleových kyselin až po sacharidy a lipidy. Díky tomu lyzozomy zajišťují nejen recyklaci buněčného materiálu (autofagie), ale také likvidaci látek pocházejících z vnějšího prostředí (endocytóza). Kromě těchto základních funkcí se lyzozomy účastní i regulace buněčného metabolismu, opravy buněčné membrány a v případě potřeby spouštějí programovanou buněčnou smrt (apoptózu). Navíc slouží i jako zásobárny vápníku (Ca^{2+}), který hraje roli v řadě buněčných procesů (Ballabio a Bonifacino 2020).

Tvorba nových lyzozomů (lyzozomální biogeneze) je řízena komplexní sítí genů známou jako CLEAR (koordinovaná lyzozomální exprese a regulace) zahrnující transkripční faktory EB (TFEB), E3 (TFE3) a mitochondriální translační iniciační faktor (MTIF) (**Obr. 1.5**).



Obr. 1.5: CLEAR signální dráha. Převzato a upraveno z (Grimm et al. 2018).

Klíčovým hráčem v této síti je transkripční faktor TFEB, který zahajuje expresi genů nezbytných pro tvorbu lyzozomů. Nicméně, aktivita TFEB je pod přísnou kontrolou mTORC1 (z angl. mammalian target of Rapamycin Complex 1), což je komplex citlivý na živiny a energetický stav buňky. Za příznivých podmínek, kdy je buňka dostatečně zásobena živinami a energií, mTORC1 fosforyluje TFEB. To vede k jeho vazbě na 14-3-3 proteiny a tato interakce udržuje TFEB v cytoplazmě, mimo dosah DNA v jádře. Při stresu nebo nedostatku živin je však mTORC1 inhibován, což vede k defosforylaci TFEB (Palmieri et al. 2011; Ballabio a Bonifacino 2020). Zároveň může zvýšení hladiny Ca^{2+} v cytoplazmě aktivovat enzym kalcineurin, který také přispívá k defosforylaci TFEB. TFEB se pak translokuje do jádra, kde spouští expresi genů pro tvorbu nových lyzozomů (Palmieri et al. 2011; Medina et al. 2015). Tato regulace zajišťuje, že buňka rychle reaguje na změny ve svém okolí a udržuje rovnováhu prostřednictvím regulace počtu a aktivity lyzozomů. Lyzozomy jsou tedy klíčové orgány nejen pro buněčnou homeostázu, ale také se významně podílejí na rozvoji řady závažných onemocnění (Appelqvist et al. 2013).

Jejich dysfunkce je spojena s lyzozomálními strádavými chorobami, kde dochází k hromadění nedotráveného materiálu v buňkách. Kromě toho se lyzozomy podílejí na patogenezi kardiovaskulárních onemocnění, neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba a amyotrofická laterální skleróza, a dokonce i na rozvoji a progresi nádorů (Ballabio a Bonifacino 2020). Tento význam je zvláště patrný v případech, kdy nedostatečné zásobení nádorů krví omezuje dostupnost živin. Výzkumy ukázaly, že několik typů nádorů, včetně karcinomu slinivky, plic, prsu a prostaty, stejně jako glioblastom a melanom, spoléhá na aktivaci lyzozomálně-autofagické degradace a recyklačních procesů, které slouží jako mechanismy získávání živin (Kimmelman a White 2017; Yang a Kimmelman 2014; Gammoh et al. 2016). Warburgův efekt, charakteristický pro metabolismus nádorových buněk, vede k hromadění kyselých metabolitů, které mohou být pro buňku toxické. Aby se buňka detoxikovala, využívá protonové pumpy a transportéry, jako je V-ATPáza, NHE1 (Na^+/H^+ výměník), MCT (monokarboxylátové transportéry), CA-IX (karboanhydrázy) a další, které pumpují protony ven z buňky nebo do lyzozomů (Daniel et al. 2013). Následná exocytóza lyzozomálního obsahu přispívá k vytváření kyselého nádorového mikroprostředí, které podporuje aktivaci proteáz a degradaci extracelulární matrix. Tyto procesy jsou zásadní pro růst nádoru, tvorbu nových cév (angiogenezi), invazi a metastázování (Fais 2010). Jak již bylo zmíněno, lyzozomy hrají roli i ve vzniku chemorezistence. V důsledku pH gradientu, který vytváří protonová pumpa V-ATPáza, dochází ke vstupu léčiva do lyzozomu a jeho následné protonaci. V-ATPázy okyselují nádorové mikroprostředí, protože se nacházejí v plazmatické membráně a membránách intracelulárních vakuol – lyzozomů a endozomů. Sekvestrace a inaktivace protinádorových léčiv v těchto kyselých organelách a jejich následná extruze z buňky představuje jeden z možných mechanismů mnohočetné lékové rezistence (Hraběta et al. 2020).

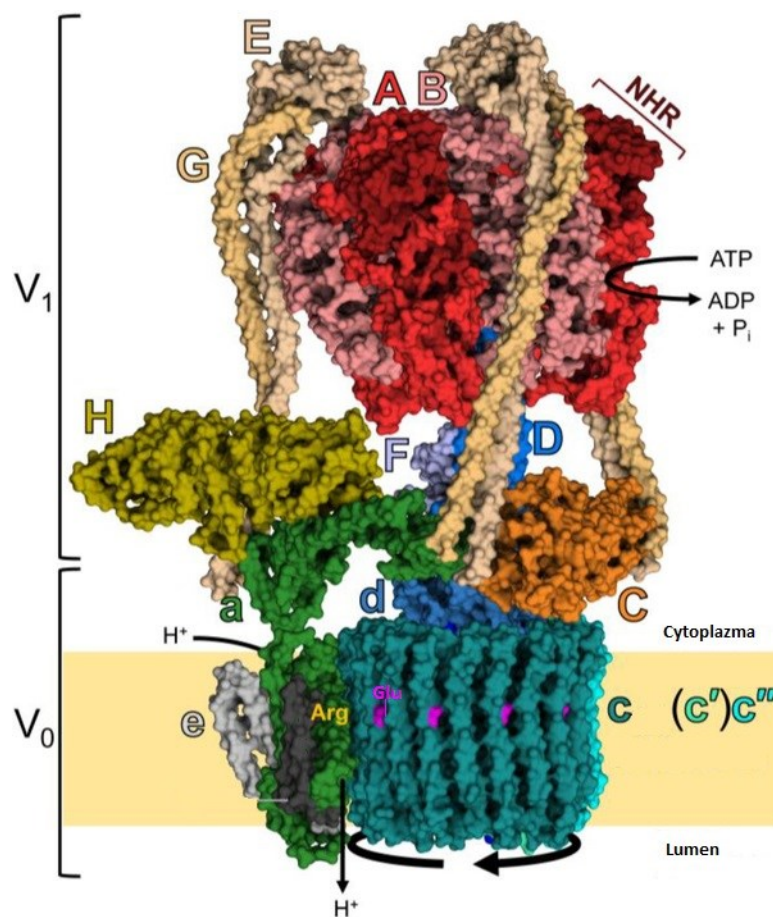
1.4 V-ATPáza

1.4.1 Funkce a struktura V-ATPázy

Primární funkcí H^+ -ATPázy (též V-ATPázy) je aktivní transport protonů (H^+) přes membrány, což vede k vytvoření elektrochemického gradientu. Tento gradient je zásadní pro řadu buněčných procesů, například pro intracelulární transport, degradaci makromolekul

a udržování optimálního pH v organelách, jako jsou lysozomy a endozomy. Okyselení těchto organel je nezbytné pro jejich správnou funkci a umožňuje například rozklad látek nebo aktivaci enzymů (Harrison a Muench 2018). Kromě toho V-ATPázy hrají důležitou roli v řadě specializovaných buněk v různých orgánových systémech. Jsou tak nezbytné pro celou škálu fyziologických procesů, včetně těch probíhajících v ledvinách, kostech, mužském reprodukčním systému, vnitřním uchu a čichovém epitelu (Eaton et al. 2021).

V-ATPáza je komplexní enzym složený ze čtrnácti podjednotek, které jsou uspořádány do dvou funkčně odlišných domén: cytosolické V1 (podjednotky A-H) a membránové V0 (podjednotky a, d, e, c, c', c'') (**Obr. 1.6 a Tab. 1.2**) (Wang et al. 2020). Podjednotky A a B se střídají a tvoří hexamerní kruh (A3B3), který je místem vazby a hydrolýzy ATP (adenosintrifosfát) (Maher et al. 2009). Podjednotky D a F tvoří centrální stopku, která prochází středem hexameru A3B3 a spojují V1 doménu s V0 doménou. Heterodimer podjednotek E a G tvoří tři periferní stopky (EG41, EG2 a EG3), které stabilizují komplex a přispívají k přenosu energie z V1 do V0 domény (Zhang et al. 2008; Forgac 2007). Podjednotka H se nachází na periférii V1 domény a reguluje aktivitu enzymu. V0 doména je ukotvena v membráně a je zodpovědná za translokaci protonů přes membránu. Její podjednotky c, c' a c'' tvoří proteolipidový kruh účastnící se translokace protonů, stejně jako podjednotka a ve které jsou umístěny hemikanály. Podjednotka d je součástí centrální stopky a podílí se na propojení V0 domény s V1 doménou, zatímco funkce podjednotky e není známá, ale její umístění naznačuje, že se jedná o statorovou podjednotku. Hexamer A3B3 obsahuje tři katalytické ATP vazebné kapsy, kde dochází k jeho hydrolýze na ADP a fosfát. Tato reakce uvolňuje energii, která je využita k rotaci centrální stopky a následně proteolipidového kruhu. Podjednotka a obsahuje dva vodné hemikanály: hemikanál směřující k cytosolu umožňuje vstup protonů, zatímco hemikanál směřující do lumenu umožňuje jejich výstup. Jak protony vstupují z cytosolu, protonují skrytý glutamátový zbytek obsažený v každé proteolipidové podjednotce. Rotace proteolipidového kruhu způsobí, že protonované glutamáty se postupně setkávají s kritickým skrytým argininovým zbytkem v podjednotce a, což umožňuje uvolnění protonu a výstup přes hemikanál směřující k lumenu (Forgac 2007; Collins a Forgac 2020; Toei et al. 2010). A3B3 hexamer, EG stopky, podjednotky C, H a a tedy tvoří stacionární subkomplex (stator). Rotační subkomplex (rotor) je tvořen centrální stopkou (D, F a d) a proteolipidovým kruhem (Collins a Forgac 2020).



Obr. 1.6: Struktura a mechanismus V-ATPázy. Podjednotka A také obsahuje 100 aminokyselinovou nehomologní oblast (NHR), c' se navíc vyskytuje u kvasinek, argininový zbytek (žlutě Arg), zbytky kyseliny glutamové (růžově Glu). Převzato a upraveno z (Collins a Forgac 2020).

Tab. 1.2: Charakteristika podjednotek V-ATPázy, Ac45 (doplňková podjednotka-45), Ac45LP (protein podobný Ac45), NEF (negativní replikační faktor), RAVE (regulátor ATPázy vakuolárních a endozomálních membrán), SFD (dimer pod padesát osm kDa), VMA (aktivita ATPázy vakuolární membrány). Převzato a upraveno z (Toei et al. 2010).

Podjednotky	Molekulová hmotnost (kDa)	Gen kvasinek	Savčí izoformy		Funkce podjednotky
V1 doména			tkáň/buňka	Alternativní sestřih	
A	70	VMA1			ATP hydrolytické místo, regulace prostřednictvím nehomologní domény
B	60	VMA2	B1 (renální, epididymis, čichový epitel); B2 (všudypřítomná)		Nekatalytické místo ATP, váže aktin a aldolázu
C	40	VMA5	C1 (všudypřítomná); C2 (plíce, renální, epididymis)	C2a (plíce) C2b (ledviny)	Regulační, satorová podjednotka, váže aktin
D	34	VMA8			Rotační podjednotka
E	33	VMA4	E1 (varle, čichový epitel); E2 (všudypřítomná)		Statorová podjednotka, váže RAVE a aldolasu
F	14	VMA7			Rotační podjednotka
G	13	VMA10	G1 (všudypřítomná)); G2 (neurální); G3 (renální, , epididymis)		Statorová podjednotka, váže RAVE
H	50	VMA13		SFD-α SFD-β	Regulační, satorová podjednotka, váže NEF
V0 doména					
a	100	VPH1 (vacuole) STV1 (Golgi)	a1 (neurální); a2 (endoteliální, neurony); a3 (osteoklasty, β-buňky pankreatu, melanozomy); a4 (renální, epididymis)	a1-I (mozek, neurony), a1-II (všudypřítomná), a1-III (všudypřítomná), a1-IV (neurony); a3-I (všudypřítomná), a3-II (všudypřítomná), a3-III (srdce, plíce), a4-I (ledviny, srdce, plíce, kosterní svaly, varlata), a4-II (ledviny, plíce, játra, varlata)	H ⁺ transport, cílení, váže aldolázu, satorová podjednotka
d	38	VMA6	d1 (všudypřítomná) d2 (renální, epididymis, osteoklasty, dendritické buňky)		Spojovací, rotační podjednotka
e	9	VMA9			Neznámá
c	17	VMA3			H ⁺ transport, rotační podjednotka
c'	17	VMA11	není		H ⁺ transport, váže Vma21 spojovací faktor, rotační podjednotka
c''	21	VMA16			H ⁺ transport, rotační podjednotka
Ac45	45	není	Ac45 Ac45LP (<i>Xenopus</i>)		neznámá

1.4.2 Regulace a patologie V-ATPázy

Mezi klíčové mechanismy regulace V-ATPázy patří reverzibilní disociace na jednotlivé V1 a V0 domény v závislosti na různých podněty (Collins a Forgac 2020). Jedním z těchto podnětů je změna extracelulárního pH; zvýšení pH vede k pozitivní modulaci aktivity V-ATPázy (Collins a Forgac 2020). V kvasinkách interakce s glykolytickými enzymy (aldolázou a fosfofruktokinázou) a faktor RAVE (z angl. Regulator of the ATPase of Vacuolar and Endosomal membranes) podporují sestavení komplexu v podmínkách nedostatku glukózy, přičemž RAVE vykazuje specifitu pro vakuolární V-ATPázy (Kane 2012). U vyšších eukaryot je regulace komplexnější, podobnou roli jako RAVE zastává rabconnectin 3. Dále zahrnuje signalizaci prostřednictvím PKA (proteinkináza A), PI-3 kinázy (osfatidylinositol-3-kináza), mTOR a ERK (kináza regulovaná extracelulárním signálem) (Diakov a Kane 2010; Eaton et al. 2021). Sestavení V-ATPázy hraje roli v různých buněčných procesech, včetně imunitní tolerance, virové infekce a buněčného metabolismu (Forgac 2007). Další důležitou formou regulace V-ATPázy je zacílení V-ATPáz do různých buněčných membrán, které je řízeno izoformami podjednotky a (u savců kódované geny *ATP6V0A1*, *ATP6V0A2*, *TCIRG1* a *ATP6V0A4*) (Miranda et al. 2010). Aktivita V-ATPázy může být také reverzibilně regulována tvorbou disulfidické vazby mezi dvěma cysteiny v katalytickém místě V1A podjednotky, což vede k uzavřené konformaci, inhibici enzymatické aktivity a hydrolyze ATP, přičemž obnovení aktivity je zajištěno thiodisulfidovou výměnou (Miranda et al. 2010). Úplná ztráta aktivity V-ATPázy je smrtelná v raném stádiu vývoje savců.

Inhibice V-ATPázy zvyšuje citlivost nádorových buněk vůči cytostatikům a omezuje růst některých typů nádorů. Krátkodobá inhibice spouští buněčnou stresovou reakci a autofagii, zatímco dlouhodobá inhibice vede k apoptóze. Mutace v jednotlivých podjednotkách lidské V-ATPázy však způsobují odlišné fenotypové projevy. Například germinální mutace izoformy *ATP6V0a1* vedou k četným neurologickým poruchám, mutace v *ATP6V0a2* jsou spojeny s autozomálně recesivní cutis laxa a ztráta funkce v důsledku mutací v *ATP6V0a3* je spojena s autozomálně recesivní osteopetrózou (Forgac 2007; Tuli a Kane 2023). Zajímavé je, že screening knihovny cDNA lidských plic odhalil přímou interakci mezi izoformou podjednotky G1 V-ATPázy a 3CLpro (3 C-like proteináza) exprimovaným koronavirem SARS. Podjednotka G1 navíc obsahuje štěpící místo pro 3CLpro, což bylo potvrzeno experimenty s buněčnou kulturou, kde byla tato podjednotka štěpena virovou proteázou. Štěpení podjednotky G1

korelovalo se snížením intracelulárního pH v buňkách exprimujících 3CLpro, což naznačuje, že toto štěpení může zvýšit aktivitu V-ATPázy a podpořit tak tvorbu gradientu pH, který je nezbytný pro replikaci mnoha virů (Miranda et al. 2010). Dysregulace V-ATPázy byla identifikována u mnoha typů nádorů, např. zvýšená membránová exprese V-ATPázy byla pozorována u řady nádorových buněk, včetně vysoce invazivních buněk karcinomu prsu a melanomových buněk (Cotter et al. 2015; Nishisho et al. 2011; Sennoune et al. 2004). Bylo popsáno, že exprese podjednotek V-ATPázy ATP6V1E a ATP6V0c koreluje se stadiem u duktálního adenokarcinomu pankreatu (Chung et al. 2011; Ohta et al. 1996), zatímco exprese ATP6V0D1 negativně koreluje s prognózou osteosarkomu (Zhang et al. 2022). Navíc byly u gliomu popsány specifické expresní profily jednotlivých podjednotek V-ATPázy v závislosti na prognóze (Terrasi et al. 2019).

Tyto poznatky naznačují, že jednotlivé podjednotky V-ATPázy plní v nádorových buňkách specifické funkce. Detailní pochopení jejich exprese a dysregulace by mohlo vést k identifikaci nových diagnostických markerů a terapeutických cílů.

2 Cíle dizertační práce

Cílem této dizertační práce je charakterizovat expresi podjednotek V-ATPázy v buňkách NBL, prozkoumat jejich potenciální dysregulaci a objasnit jejich příspěvek k chemorezistenci vůči elipticinu a cisplatině a případnou roli v dalších biologických procesech.

Konkrétně:

- Porovnat expresi všech podjednotek V-ATPázy u chemosensitivní UKF-NB-4 a rezistentních NBL linií UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP}
- Sledovat vstup lyzozomálního barviva a porovnat rozdíly mezi linií senzitivní a rezistentními
- Zavést inhibitory jak celkové V-ATPázy, tak inhibici jejích konkrétních podjednotek dysregulovaných u chemorezistentních buněk
- Zjistit, zda inhibice V-ATPázy zvýší citlivost k vybraným cytostatikům, a které cytotoxické látky jsou potencovány, případně inhibovány inhibitory V-ATPázy
- Ověřit souvislost mezi expresí V-ATPázy a rozvojem rezistence na cisplatinu u pacientů s neuroblastomem
- Ověřit chování (proliferace, buněčný cyklus, migrace) NBL buněk po inhibici jak celkové V-ATPázy, tak jejích konkrétních podjednotek

3 Materiál a chemikálie

Bio-Rad (USA): kit pro stanovení koncentrace proteinů (DC Protein Assay), Laemmliho vzorkový pufr, sušené mléko (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk), nitrocelulózová membrána 0,45 µm

Carl Roth (Německo): merkaptoethanol

Cell Signaling Technology (USA): tunicamycin, myší monoklonální protilátka proti Ubiquitinu (Ubi-1), králičí monoklonální protilátka proti Calnexinu, králičí monoklonální protilátka proti PERKu, myší monoklonální protilátka proti Alixu, králičí monoklonální protilátka proti Bipu,

Dharmacon (USA): smart pool siRNA ON-TARGETplus Human ATP6V0D1, ATP6V1H, kontrolní Lincode non-targeting siRNA (siNC), 5x siRNA pufr, transfekční činidlo DharmaFECT

Fluka (Německo): Ponceau S, amonium peroxodisulfát (APS), 1,2-bis (dimethylamino) ethan (Temed), Igepal CA 630,

Generi Biotech (ČR): kit pro reverzní transkripci gb Reverse Transcription Kit, primery a sondy značené FAM: Assay qPCR hPOLR2A, hATP6V0D1_Q2, hATP6V0A1_Q1, hATP6V0E1_Q1, hATP6V0B_Q1, hATP6V0C_Q1, hATP6V1A_Q2, hATP6V1B2_Q1, hATP6V1C1_Q1, hATP6V1F_Q2, hATP6V1E2_Q1, hATP6V1D_Q1, hATP6V1H_Q2, hATP6V1G1_Q1

GIBCO, Thermo Fisher Scientific (USA): Iscove's modified Dulbecco's medium s glutaminem (IMDM), sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (z angl. phosphate buffered saline - PBS), fetální hovězí sérum (FBS), dodecylsulfát sodný (SDS), Hanks' balanced salt solution (HBSS)

Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (USA): 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid (MTT), králičí monoklonální protilátka proti fosforylovanému PERK (p-PERK);

Molecular Devices (USA): sekundární kozí protilátky proti králičím a myším protilátkám značené europiem;

Penta (ČR): kyselina octová, methanol, bromfenolová modř;

PLIVA-Lachema (ČR): kyselina chlorovodíková;

Quiagen (Německo): kit pro izolaci RNA RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50);

Roche Diagnostic (Švýcarsko): proteasové inhibitory Complete mini protease inhibitors, směs inhibitorů fosfatáz PhosSTOP;

Santa Cruz Biotechnology (USA): myši monoklonální protilátka proti ATP6V0D1, myši monoklonální protilátka proti ATP6V1H;

Sigma Aldrich (USA): Tris, Tris-HCl, HCl, NaCl, glycin, bovinní sérový albumin, inhibitor proteazomu MG-132, ellipticin (ELLI), MPP⁺ (1-methyl-4-fenylpyridin), formaldehyd, bafilomycin A (BAF), myši monoklonální protilátka proti aktinu, glycerol, akrylamid/bis-akrylamid, deoxycholát sodný, polyoxyethylensorbitan-monolaurát (TWEEN 20), cycloheximid;

Teva (Izrael): cisplatina (CDDP);

Thermo Fisher Scientific (USA): PrestoBlue Cell Viability Reagent, lyzozomální barvivo LysoTracker Deep Red (LTR), kit pro izolaci RNA PureLink RNA Mini Kit, guanidine hydrochlorid, trypsin, konjugovaná sekundární králičí protilátka Anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 647, FxCycle™ Violet Ready Flow™ Reagent pro analýzu buněčného cyklu, barvivo endoplasmatického retikula ER-Tracker Red (ETR), mitochondriální barvivo MitoTracker Deep Red FM (MTR), chelator vápníku BAPTA-AM;

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

Lidská NBL linie UKF-NB-4 s amplifikací genu MYCN a od ní odvozená linie rezistentní na cisplatinu UKF-NB-4^{CDDP} byly získána darem od prof. J. Činátla Jr. (J. W. Goethe University, Frankfurt, Německo). Linie rezistentní vůči ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} byla připravena dlouhodobou kultivací linie UKF-NB-4 se stoupajícími dávkami ellipticinu v laboratoři Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice Motole (Procházka et al. 2012).

4 Experimentální metody

4.1 Kultivace buněčných linií

NBL buněčné linie (UKF-NB-4, UKF-NB-4^{ELLI}, UKF-NB-4^{CDDP}) byly kultivovány v IMDM médiu, obohaceném o 10 % FBS. Všechny buněčné linie rostly přisedle na povrchu kultivačních nádob o ploše 25 cm² nebo 75 cm² v inkubátoru Thermo Scientific HeraCell Vios 160i (USA) při 37 °C s 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu. Buněčné linie byly pasážovány v pravidelných intervalech 2x týdně. Buňky byly promyty PBS a následně uvolňovány 0,05% roztokem trypsinu v PBS a resuspendovány v čerstvém médiu. Rezistentní buněčné linie byly kultivovány s příslušnými cytostatiky o koncentracích uvedených v **Tab. 4.1**. Dvě pasáže před provedením experimentů, byly tyto linie kultivovány bez přidavku cytostatik, aby se minimalizoval jejich vliv na buňky.

Tab. 4.1: Koncentrace cytostatik přidávaných k příslušným liniím pro udržení rezistence

Buněčná linie	Cytostatikum	Koncentrace cytostatika [μM]
UKF-NB-4 ^{ELLI}	ellipticin	2,5
UKF-NB-4 ^{CDDP}	cisplatina	3

4.2 Příprava buněk pro experimenty

Testovanými látkami v této práci byly cytostatika ellipticin a cisplatina. NBL buněčné linie byly nasazeny na kultivační misky tak, aby v každé byla koncentrace buněk 2 x 10⁵ buněk/ml. Buňky byly počítány na počítadle buněk BIO-RAD TC 20 (USA). Misky byly poté umístěny na 24 hodin do inkubátoru při 37 °C s 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu pro přisednutí buněk na dno kultivační nádoby. Následně bylo k buňkám na dalších 24 hodin přidáno příslušné cytostatikum o koncentracích, uvedených v **Tab. 4.2** a kultivační nádoby byly opět umístěny do inkubátoru.

Tab. 4.2: Přehled vzorků buněčné linie UKF-NB-4 senzitivní a linií rezistentních k ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} nebo k cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} připravených pro následné analýzy. Buňky byly s jednotlivými cytostatiky kultivovány po dobu 24, linie bez přídavku cytostatika byly použity jako kontrolní.

UKF-NB-4		UKF-NB-4 ^{ELLI}	UKF-NB-4 ^{CDDP}
ellipticin	cisplatina	ellipticin	cisplatina
5 µM	20 µM	5 µM	20 µM

4.3 Stanovení viability buněk

Pro stanovení koncentrace způsobující 50% úmrtnost buněk (IC₅₀) a detekci viability byly v této práci využity kolorimetrické testy MTT a PrestoBlue, založené na podobném principu stanovení metabolické aktivity buněk.

4.3.1 MTT test

MTT test byl proveden za účelem stanovení cytotoxicity testované látky. Pro experiment byly použity 96-jamkové mikrotitrační destičky. Do prvního sloupce každé destičky bylo napipetováno 100 µl kompletního média IMDM, které sloužilo jako kontrola. Do druhého až dvanáctého sloupce bylo napipetováno 50 µl IMDM. Testovaná látka o příslušné koncentraci byla napipetována do posledního (12.) sloupce v objemu 50 µl. Následně byla pipetována „dvojkovou řadou“ do předchozích sloupců destičky až k 3. sloupci, čímž se dosáhlo sériového ředění testované látky. Do druhého až dvanáctého sloupce bylo dále přidáno 10 000 buněk v 50 µl média. Mikrotitrační destička byla následně umístěna do inkubátoru a inkubována po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo do všech sloupců přidáno 50 µl MTT (2 mg/ml v PBS) a destička byla opětovně umístěna do inkubátoru na 2 hodiny. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 µl 50% N, N-dimethylformamidu v 20% SDS (pH 4,5-5) a obsah jamek byl důkladně promíchán. Absorbance byla měřena při vlnové délce 570 nm spektrofotometrem Molecular Devices VERSA max (USA). Optická denzita média byla

odečtena jako pozadí. Hodnota optické density kontrolních buněk (2. sloupec) byla brána jako 100 %. IC₅₀ byla vypočtena programem SoftMax Pro.

4.3.2 PrestoBlue assay

Pro stanovení dopadu inhibice V-ATPázy na viabilitu byly buňky nasazeny do 24-jamkové destičky o hustotě 4×10^4 buněk/jamku ve 350 μ l IMDM média a destičky byly umístěny do inkubátoru na 24 hodin při 37°C. Poté bylo odstraněno médium a buňky byly transfekovány siRNA (viz kapitola 4.4. Transfekce buněk) a inkubovány 48h při 37 °C, nebo bylo přidáno 350 μ l testované látky o příslušné koncentraci a buňky byly inkubovány po dobu 24 h při 37 °C. Následně bylo přidáno 17,5 μ l PrestoBlue Cell Viability Reagent činidla a buňky byly inkubovány dalších 30 minut při 37 °C. Fluorescence byla měřena pomocí přístroje SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) s excitační vlnovou délkou 560 nm a emisní vlnovou délkou 590 nm. Jako kontrola byly použity netransfekované buňky a buňky bez přídavku testovaných látek, jejichž viabilita byla stanovena jako 100 %.

4.4 Transfekce buněk

Pro transfekci buněk byla využita transfekční reagentie DharmaFECT, která umožňuje vstup specifické dvouvláknové molekuly siRNA (z angl. small interfering RNA) do buněk. Po vstupu do buňky se siRNA začlení do komplexu RISC (z angl. RNA-induced silencing complex). Zde jedno vlákno siRNA (tzv. "guide strand") komplementárně hybridizuje s cílovou mRNA (z angl. messenger RNA), což vede k její degradaci a tím k zablokování její translace do proteinu. Tento proces efektivně umlčuje genovou expresi.

Buňky byly nejprve nasazeny na kultivační misky nebo destičky a po 24-hodinové inkubaci transfekovány roztoky siRNA. Prvním krokem byla příprava transfekční směsi. Transfekční činidlo DharmaFECT a příslušná siRNA (siNC, siATP6V0D1, siATP6V1H1) byly naředěny IMDM médiem bez přídavku FBS v poměru 1:49 a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byl k roztokům siRNA přidán v poměru 1:1 připravený roztok DharmaFECTu a směs byla inkubována 20 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo k roztokům siRNA přidáno kompletní médium (IMDM médium + 10 % FBS) v poměru 1:4. Po výměně média za roztok příslušné siRNA v IMDM byly buňky inkubovány 48 hodin při 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti.

4.5 Stanovení exprese mRNA

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR) je modifikace klasické PCR, která umožňuje kvantitativní analýzu specifické sekvence cDNA v reálném čase. Amplifikace je detekována pomocí fluorescenčních sond, které se váží na zmnožené úseky DNA. Specifické sondy, jako například TaqMan systém použitý v této práci, hybridizují na konkrétní sekvenci DNA.

4.5.1 Izolace RNA z neuroblastomových buněčných linií

Izolace RNA byla prováděna za použití kitu PureLink RNA Mini Kit. Vzorky buněčných linií s testovanými látkami nebo po transfekci byly pomocí pipety uvolněny z kultivačního povrchu, vzniklé suspenze byly přeneseny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány 3 minuty při $300 \times g$ ve stolní centrifuze Hettich UNIVERSAL 320 (Německo) při laboratorní teplotě. Poté byly supernatanty odstraněny, pelety promyty 1 ml roztoku PBS, opět centrifugovány za stejných podmínek a vzniklé supernatanty byly odstraněny. Buněčné pelety byly resuspendovány v 600 μ l lyzačního pufru s 1 % merkptoethanolem pomocí vortexu VELP SCIENTIFICA Rw3 (Itálie). Po přidání 600 μ l 70% ethanolu a homogenizaci na vortexu byly vzorky přeneseny do tzv. spin cartridge (v tzv. collection tube) a centrifugovány 15 s při $12\,000 \times g$ v centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415 R (Německo). Po odstranění filtrátu byla RNA na spin cartridge promyta 700 μ l pufru Wash Buffer I a vzorky byly centrifugovány za stejných podmínek. Spin cartridge byly vloženy do nových collection tube a 2 x promyty 500 μ l pufru Wash Buffer II a centrifugovány za stejných podmínek. Pro vysušení membrány spin cartridge byly vzorky centrifugovány 2 minuty při laboratorní teplotě a $12\,000 \times g$. Následně byly spin cartridge vloženy do tzv. recovery tube a bylo přidáno 60 μ l RNase-free water (vody zbavené RNáz). Po minutové inkubaci při laboratorní teplotě byly vzorky centrifugovány 2 minuty při $12\,000 \times g$, čímž bylo dosaženo přenosu izolované RNA z membrány do roztoku. Koncentrace a čistota izolované RNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (USA).

4.5.2 Izolace RNA ze vzorků nádorů

Celková RNA byla izolována ze vzorků neuroblastomů získaných z Biobanky Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol za použití kitu RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). Etické aspekty výzkumu byly zajištěny získáním informovaného souhlasu rodičů pacientů před použitím biologického materiálu a souhlasem etické komise FN Motol. Vzorky tumoru byly nejprve homogenizovány a poté byl přidán 1 ml QIAzol Lysis Reagentu. Homogenát byl důkladně promíchán pomocí vortexu VELP SCIENTIFICA RW3 a inkubován při laboratorní teplotě po dobu minimálně 5 minut dokud nedošlo k úplnému rozpuštění vzorku. Následně bylo přidáno 200 μ l chloroformu, vzorky byly intenzivně protřepávány po dobu 15 sekund a poté inkubovány 3 minuty při laboratorní teplotě. Fázová separace byla provedena centrifugací při 12000 x g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C v centrifuze Eppendorf 5415R (Německo). Horní, vodná fáze obsahující RNA byla opatrně přenesena do nové zkumavky a smíchána se 70% ethanolem v poměru 1:1. Směs byla krátce promíchána vortexem. Směs RNA a ethanolu byla přenesena do tzv. RNeasy mini spin colum ve 2 ml tzv. collection tube s následnou centrifugací po dobu 15 s při 8000 x g a laboratorní teplotě. Centrifugát byl odstraněn a pro odstranění kontaminující DNA byla provedena digesce přímo na kolonce. Na kolonku bylo napipetáno 350 μ l RW1 pufru a vzorky byly centrifugovány za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Po odstranění centrifugátu bylo řidáno 80 μ l DNase I mixu (10 μ l DNase a 70 μ l RDD pufru) a tento mix se nechal působit po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 350 μ l RW1 pufru a vzorky byly centrifugovány za stejných podmínek. Centrifugát byl odstraněn a na kolonku bylo napipetováno 500 μ l RPE pufru s následnou centrifugací 15 sekund při 8000 x g a laboratorní teplotě. Tento krok byl opakován, přičemž druhá centrifugace probíhala po dobu 2 minut. Centrifugát byl odstraněn a pro úplné vysušení membrány na kolonce byly vzorky centrifugovány po dobu 1 minuty při maximálních otáčkách. Kolonky s navázanou RNA byly poté vloženy do nových 1,5 ml zkumavek a na kolonku bylo napipetováno 30 μ l RNase free water (vody zbavené RNáz) a vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 8000 x g, čímž došlo k eluci izolované RNA z membrány do roztoku. Koncentrace a čistota izolované RNA byla změřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 (USA).

4.5.3 Reverzní transkripce

Vzorky vyizolované RNA byly naředěny vodou zbavenou RNáz tak, aby koncentrace na reakci činila 500 ng a celkový objem vzorku byl 10 μ l. K přepisu RNA do cDNA byl použit kit pro reverzní transkripci od Generi Biotech gb Reverse Transcription Kit, který se skládá z Mixu A a Mixu B, jejichž smícháním vznikne kompletní Reverse Transcription Mastermix obsahující pufr, dNTP, primery (hexamery, oligo(dT)Vn), inhibitor RNáz a enzym reverzní transkriptázu (M-MLV). 10 μ l vzorku RNA bylo smícháno s 10 μ l Reverse Transcription Mastermix. Reakční směs byla umístěna do termocykleru SensoQuest Labcycler (Německo) a byl zvolen následující program: 42 °C po dobu 60 minut a poté 4 °C ∞ .

4.5.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR)

Pro qRT-PCR byly použity primery pro sledované geny hATP6V0D1_Q2, hATP6V0A1_Q1, hATP6V0E1_Q1, hATP6V0B_Q1, hATP6V0C_Q1, hATP6V1A_Q2, hATP6V1B2_Q1, hATP6V1C1_Q1, hATP6V1F_Q2, hATP6V1E2_Q1, hATP6V1D_Q1, hATP6V1H_Q2, hATP6V1G1_Q1 a pro kontrolní gen hPOLR2A s FAM (6-Carboxyfluorescein) značenými fluorescenčními specifickými sondami, které byly navrženy a připraveny v Generi Biotech. Každá 20 μ l reakce sestávala z: 10 μ l Universal Master Mixu, 2 μ l primeru s FAM fluorescenční značkou, 6 μ l RNase free vody a 2 μ l vzorku cDNA z předešlého kroku. Každý vzorek byl vyšetřen v triplikátu. Vzorky byly umístěny do cycleru QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) a byl nastaven následující teplotní program:

3 minuty: 95 °C

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

∞ : 4 °C

V rámci vyhodnocení výsledků byla aplikována metoda relativní kvantifikace, která umožňuje stanovit změnu v expresi cílového genu v porovnání s genem referenčním, tzv. housekeeping genem, vyznačujícím se konstantní hladinou exprese za definovaných experimentálních podmínek. Jako referenční gen zvolen *POLR2A* z důvodu jeho homogenní a uniformní exprese

v buňkách neuroblastomu (NBL) (Di Paolo et al. 2020; Olechnowicz et al. 2012; Bachetti et al. 2010). Pro výpočet reativní exprese cílového genu byla použita srovnávací $\Delta\Delta C_t$ metoda. K výpočtu celkového množství cílového genu byl použit REST 2009 software používající vztah: $R=2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ kde: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ vzorku} - \Delta C_t \text{ kontrola}$ (Pfaffl et al. 2002)

4.6 Stanovení exprese proteinů pomocí metody Western blot

Western blot je analytická metoda používaná k detekci specifických proteinů ve vzorku tkáně nebo buněčného extraktu. Metoda se po izolaci proteinů skládá ze tří hlavních kroků: 1. elektroforetická separace proteinů (SDS-PAGE): Proteiny jsou denaturovány a separovány podle své molekulové hmotnosti pomocí gelové elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS. 2. přenos separovaných proteinů na membránu (blotting): Separované proteiny jsou přeneseny z gelu na pevnou membránu (obvykle nitrocelulózovou nebo PVDF) pomocí elektrického proudu. 3. detekce proteinu: cílový protein je detekován pomocí specifické primární protilátky, která s ním interaguje. Následně se použije značená sekundární protilátka, která se váže na primární protilátku a umožňuje vizualizaci cílového proteinu.

4.6.1 Izolace proteinů

Vzorky buněčných linií s testovanými látkami nebo po transfekci byly pomocí pipety uvolněny z kultivačního povrchu, vzniklé suspenze byly přeneseny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány 3 minuty při $300 \times g$ ve stolní centrifuze Hettich UNIVERSAL 320 (Německo) při laboratorní teplotě. Poté byly supernatanty odstraněny, pelety promyty 1 ml roztoku PBS, opět centrifugovány za stejných podmínek a vzniklé supernatanty byly odstraněny. Buněčné pelety byly resuspendovány v 1-3 x objemu pelety v roztoku pufru RIPA (1% Igepal CA 63; 0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS; v PBS), ke kterému byl přidán tzv. Complete protease inhibitor cocktail v poměru 1:24. Pro stanovení fosforylovaných proteinů bylo na 480 μ l RIPA přidáno 20 μ l PhosStop inhibitoru. Buňky byly v tomto lyzačním pufru inkubovány po dobu 60 min na ledu. Následně byly vzorky centrifugovány při 4°C po dobu 20 min při 15 000 rpm na centrifuze Hettich Universal 320R (Německo). Získaný supernatant obsahující proteiny byl přenesen do nové mikrozkuhavky.

4.6.2 Stanovení koncentrace proteinů dle Lowryho

Koncentrace proteinů izolovaných v předešlém kroku byly stanoveny metodou podle Lowryho (Lowry et al. 1951) s využitím komerčně dostupné sady DC Protein Assay (Bio-Rad), která obsahuje reagent A, B a S. Pro stanovení koncentrace proteinů byl připraven kalibrační roztok bovinního sérového albuminu (BSA) o koncentraci 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 a 2,8 mg/ml. Jako "slepý" vzorek byla použita destilovaná voda a pufr RIPA. Vzorky proteinů byly 8x naředěny destilovanou vodou. Do mikrotitrační destičky bylo v triplicátu napipetováno 5 μ l vzorku proteinu a v duplikátu standard BSA. Následně bylo do každé jamky přidáno 25 μ l roztoku A' (1000 μ l roztoku A a 20 μ l roztoku S) a 200 μ l roztoku B. Po 15 minutách inkubace při laboratorní teplotě za mírného míchání na třepačce Labnet Gyro Twister (USA) byla měřena absorbance při vlnové délce 750 nm na spektrofotometru Molecular Devices VERSA max (USA). Získaná data byla analyzována softwarem SoftMax Pro.

4.6.3 Elektroforetická separace proteinů (SDS-PAGE)

Pro separaci izolovaných proteinů byla použita sodnododecylsulfát-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) s diskontinuálním gelovým systémem. Separační gel (16%, 10 ml) byl připraven smícháním 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 3,94 ml 40% akrylamidu/bis-akrylamidu (29:1), 100 μ l 10% SDS, 10 μ l TEMED a 100 μ l 10% APS a doplněním destilovanou vodou do 10 ml. Po polymeraci separačního gelu mezi vertikálními elektroforetickými skly byl na něj nanesen zaostřovací gel (6%, 5 ml) složený z 1,25 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 750 μ l 40% akrylamidu/bis-akrylamidu (29:1), 50 μ l 10% SDS, 10 μ l TEMED a 50 μ l 10% APS, doplněný destilovanou vodou do 5 ml. Takto připravený gel byl umístěn do elektroforetické aparatury BIO-RAD (USA) a ponořen do 700 ml elektrodového pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS; ředění 1:10 deionizovanou vodou). Vzorky proteinů (40 μ g na jamku) byly smíchány s Laemmliho vzorkovým pufrem (Bio-Rad) v poměru 3:1 (vzorkový pufr:vzorek proteinů), inkubovány 5 minut při 100 °C ve výhřevném bloku Techne Dri-block heater (UK) a následně zchlazeny na ledu. Do každé jamky gelu bylo nanášeno 7 μ l standardu molekulových hmotností Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad) a 20 μ l vzorku proteinů. Elektroforéza probíhala při konstantním proudu 40 mA po dobu přibližně 80 minut.

4.6.4 Western blot

Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu byl proveden za použití aparatury firmy BIO-RAD (USA). Elektroforetický gel se separovanými proteiny byl umístěn mezi dvěma listy filtračního papíru a nitrocelulózovou membránou, které byly vloženy mezi tzv. fiber pady. Celá sestava byla ponořena do přenosového pufru (3,05 g Tris, 14,5 g glycinu v 10% methanolu) a umístěna do lednice. Přenos proteinů probíhal 80 minut při konstantním proudu 350 mA. Účinnost přenosu byla ověřena vizualizací proteinů pomocí Ponceau S. Poté byl barvicí roztok odmyt roztokem Tris Buffered Saline (TBS; 24,23 g Tris Base, 87,66 g NaCl, doplněno destilovanou vodou do 800 ml a pH upraveno na 7,6, následně doplněno destilovanou vodou do 1000 ml) ředěným destilovanou vodou 1:9. Membrány byly blokovány 1 hodinu v roztoku 5% BSA v pufru TBST (1 ml 20% TWEEN 20 v 400 ml TBS) za mírného míchání na laboratorní třepačce Labnet Gyro Twiester při laboratorní teplotě. Pro stanovení polyubiquitinylovaných proteinů byly membrány ještě před blokováním inkubovány v 4 ml roztoku guanidinu s 16 µl mercaptoethanolu po dobu 30 minut při laboratorní teplotě a následně promyty roztokem TBS. Následovala inkubace se specifickými primárními protilátkami proti: ATP6V0D1 (myši, 1:500), ATP6V1H (myši, 1:500), Ubiquitin 1 Ubi-1 (myši, 1:500), Calnexin (králíci, 1:1000), PERK (králíci, 1:1000), p-PERK (králíci, 1:250), Alix (myši, 1:500). β-actin (myši, 1:3000) byl použit jako kontrola nanášky. Po inkubaci přes noc při 4°C byly membrány 3x promyty roztokem TBST po dobu 5 min a inkubovány 1 hodinu s příslušnými sekundárními protilátkami konjugovanými s europiem (1:5000) při laboratorní teplotě a následně opět 3x promyty roztokem TBST po dobu 5 min. Vzniklý komplex antigen-protilátka byl vizualizován za použití přístroje SpectraMax i3x (Molecular Devices, USA).

4.7 Stanovení exprese proteinů pomocí průtokové cytometrie

Další metodou pro stanovení proteinů je průtoková cytometrie, která umožňuje kvantifikovat a analyzovat proteiny na úrovni jednotlivých buněk. Tato technika využívá specifické protilátky, které rozpoznávají cílový protein. Tyto protilátky jsou obvykle konjugovány s fluorofory. Značené buňky jsou zavedeny do průtokového cytometru, kde jednotlivě procházejí laserovým paprskem. Laser excituje fluorofory navázané na protilátky,

což vede k emisi světla o specifické vlnové délce. Intenzita emitovaného světla je detekována a zaznamenána.

Buňky vystavené působení testovaných látek byly shromážděny centrifugací a pelety byly promyty PBS a fixovány v 3,6% paraformaldehydu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Buňky byly poté promyty PBS a permeabilizovány 90% methanolem po dobu 1 hodiny při -20 °C. Pelety byly třikrát promyty 0,5% BSA v PBS a byly resuspendovány v 50 µl primární protilátky proti Bip (králíci, 1:50) a inkubovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Buňky byly promyty 0,5% BSA a následně resuspendovány v sekundární protilátce anti-králíci IgG (H+L) konjugované s fluorochromem Alexa Fluor® 647 (ředění 1:500). Po 30minutové inkubaci při laboratorní teplotě ve tmě byly buňky promyty 0,5% BSA a resuspendovány v 250 µl PBS. Měření proběhlo na průtokovém cytometru BD FACSCelesta (BD Bioscience) a data byla analyzována softwarem FlowLogic™ (Inivai Technologies). Jako negativní kontrola sloužily buňky inkubované pouze se sekundární protilátkou.

4.8 Stanovení proliferace buněk pomocí systému xCelligence

Pro monitorování buněčné proliferace byl použit systém xCELLigence RTCA DP Instrument (ACEA), který umožňuje monitorování v reálném čase na základě měření impedance, která koreluje s adherencí živých buněk bez nutnosti jejich značení.

Pro experiment byly použity speciální 16-jamkové destičky se dnem pokrytým elektrodami. Do každé jamky této destičky bylo nejprve napipetováno 50 µl media IMDM, případně media s příslušnou testovanou látkou. Destička byla umístěna do přístroje xCELLigence RTCA DP do inkubátoru a po dobu 1 minuty bylo měřeno pozadí. Poté bylo do každé jamky napipetováno 100 µl buněčné suspenze (buňky po transfekci siRNA) v počtu 10 000 buněk na jamku a umístěny zpět do přístroje. Buňky byly vystaveny působení testovaných látek po dobu 85 hodin (kultivace při 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu) a každých 30 minut byly detekovány změny impedance odpovídající pokrytí kultivační jamky buňkami (buněčný index). Data byla vyhodnocena softwarem RTCA, který je součástí přístroje.

4.9 Analýza migrace buněk metodou “wound-healing assay”

Princip metody wound healing assay (test hojení rány), někdy též nazývané scratch assay, spočívá v simulaci procesu hojení rány v buněčné kultuře a následném pozorování a kvantifikaci migrace buněk do vytvořené mezery. Tento test se používá pro studium buněčné migrace, adheze a interakce mezi buňkami.

Buňky NBL byly nasazeny na kultivační misku o ploše 9,2 cm² v hustotě 1,2 x 10⁵ buněk /ml (kultivace při 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu) a po 24 hodinách transfekovány siRNA. 48 hodin po transfekci, kdy konfluence dosáhla více než 80 %, byly mechanicky odstraněny buňky pomocí 1000μl sterilní plastové špičky za vzniku bezbuněčné rýhy (rány). Buňky byly 2x promyty roztokem PBS a po vytvoření rány byly buňky kultivovány v IMDM s 5 % FBS) a inkubovány při 37 °C v 5 % CO₂. Snímky stejného místa byly pořízeny ihned po poranění, 24 hodin a 48 hodin po poranění pomocí mikroskopu Olympus IX71 (Olympus) pro sledování zacelování rýhy. Pro analýzu byla použita softwarová aplikace ImageJ 1.52a.

4.10 Analýza buněčného cyklu

Buňky vystavené působení testovaných látek a/nebo transfekci byly shromážděny centrifugací a pelety byly promyty PBS a fixovány v 3,6% paraformaldehydu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Buňky byly poté promyty PBS a permeabilizovány 90% methanolem po dobu 1 hodiny při -20 °C. Pelety byly promyty PBS, resuspendovány v 500 ul PBS a byla přidána jedna kapka FxCycle™Violet Ready Flow™Reagent (Thermo Fisher Scientific). Po 30 minutách inkubace byla distribuce buněčného cyklu analyzována pomocí průtokového cytometru BD FACSCelesta (BD Bioscience) a data byla vyhodnocena softwarem FlowLogic™ (Inivai Technologies).

4.11 Sledování vstupu lyzozomálního barviva

Pro stanovení lyzozomálního objemu buněk (schopnosti přijímat lyzozomální barvivo) jsme měřili intenzitu fluorescence specifického lyzozomálního barviva Lysotracker Deep Red (LTR). Buňky po transfekci a bez ní byly nasazeny do 96-jamkových destiček v počtu 10⁴ buněk/jamku (50 μl) a inkubovány při 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu po dobu

24 hodin. Poté byly vystaveny testovaným látkám nebo 100 nM inhibitoru V-ATPázy bafilomycinu A, případně jejich kombinaci po dobu 30 minut, kdy bylo do každé jamky vždy přidáno 50 μ l. Následně bylo přidáno 100 μ l 50nM LTR a buňky byly inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C a promyty roztokem Hanks' balanced salt solution (HBSS). Intenzita fluorescence LTR byla měřena pomocí přístroje SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) s excitační vlnovou délkou 541 nm a emisní vlnovou délkou 713 nm.

4.12 Konfokální mikroskopie

Buňky byly nasazeny na misky se skleněným dnem (35 mm Dish with 10 mm Bottom well) tak, aby počet buněk činil $1,2 \times 10^5$ buněk/ml nebo $0,9 \times 10^5$ buněk/ml pokud byly buňky transfekovány siRNA. Buňky byly ošetřeny 5 μ M ellipticinem po dobu 4 hodin při 37°C. Následně byla přidána barviva: 25nM lyzozomální barvivo LTR, 1 μ M specifické barvivo pro endoplazmatické retikulum ER-Tracker Red (ETR) nebo 25nM mitochondriální barvivo Mito Tracker Deep Red FM po dobu 30 minut a byla monitorována subcelulární lokalizace ellipticinu a původ jím indukovaných vakuol. Pro monitorování vakuolizace byly buňky ošetřeny 10 μ M BAPTA-AM (chelátor vápníku) nebo 60 μ M cykloheximidem (inhibitor proteosyntézy) 30 minut před ošetřením ellipticinem. Pro dysregulaci Ca^{2+} byly buňky vystaveny 1 mM MPP+ po dobu 24 hodin. Buňky byly pozorovány mikroskopem Leica DMi8 (Německo) za použití programu Leica Application Suite X a všechny snímky byly snímány objektivem $\times 63$.

4.13 Statistické vyhodnocení

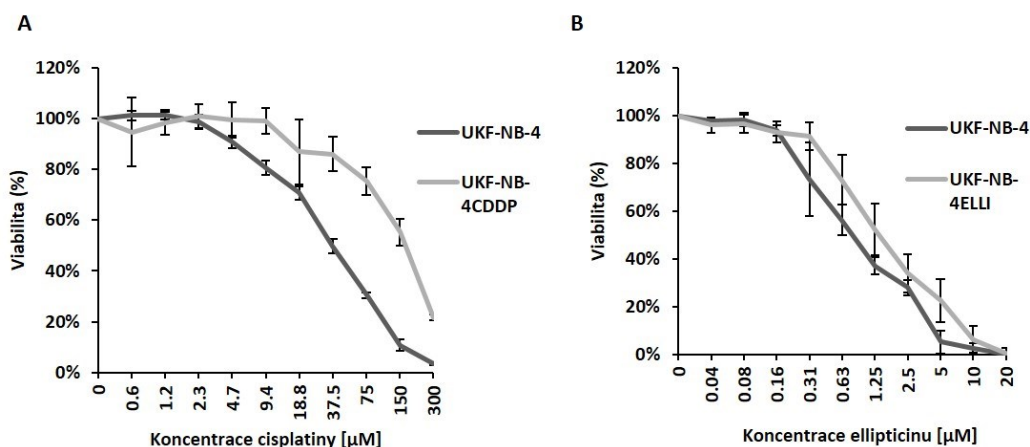
Všechny experimenty byly nezávisle opakovány alespoň třikrát a data jsou uvedena jako průměry $\pm$ směrodatná odchylka. Při porovnání situací byly použity jednostranná Anova s post-hoc Tukey HSD (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/) a oboustranná ANOVA následovaná Bonferroniho testem. Výsledky z qRT-PCR byly statisticky porovnány pomocí softwaru REST 2009 (Pfaffl et al. 2002). Význam statistických analýz je znázorněn na jednotlivých obrázcích a popsán v legendách. * hodnota $p < 0,05$ byla považována za signifikantní, ** hodnota $p < 0,01$ za velice signifikantní, *** hodnota $p < 0,001$ za výrazně signifikantní.

5 Výsledky

5.1 ATP6V0D1 podjednotka V-ATPázy vykazuje zvýšenou expresi u NBL linií rezistentních vůči cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} a ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI}

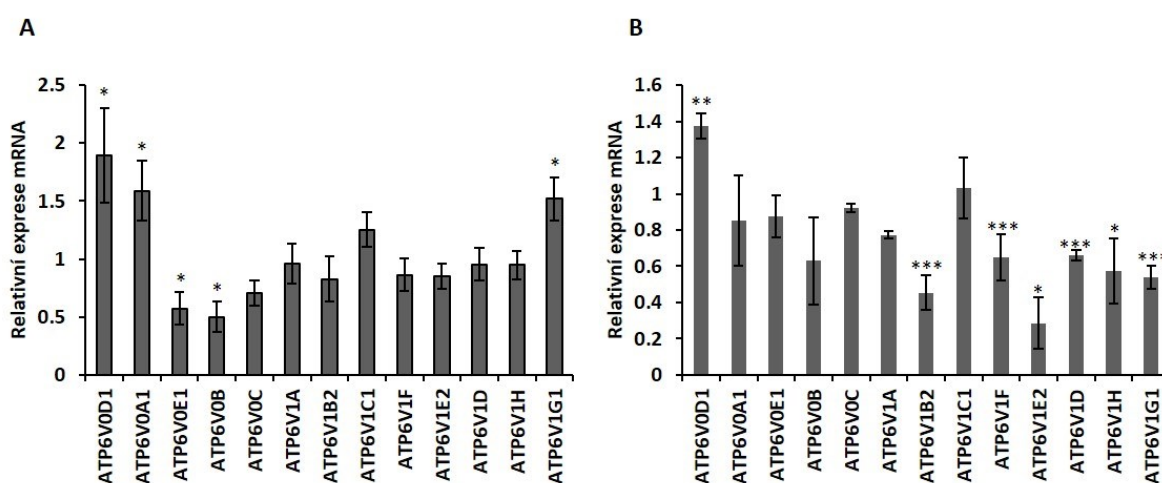
Cílem této dizertační práce je porovnat expresi V-ATPázy a jejích podjednotek u chemosenzitivní linie UKF-NB-4 a od ní odvozených linií rezistentních vůči cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} a ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI}. Pro potvrzení chemorezistence jsme si nejprve ověřili cytotoxicitu cisplatinu a ellipticinu vůči NBL liniím po 48 hodinách.

Výsledky MTT testu (viz. **Obr. 5.1**) potvrzují sníženou citlivost jak linie UKF-NB-4^{CDDP} vůči cisplatině v porovnání s linií senzitivní s IC₅₀ přibližně čtyřikrát vyšší (UKF-NB-4- 37,5 ± 1,9 μM; UKF-NB-4^{CDDP}-150 ± 12.5 μM), tak UKF-NB-4^{ELLI} linie vůči ellipticinu s IC₅₀ přibližně dvakrát vyšší (UKF-NB-4- 0,625 ± 0,037 μM; UKF-NB-4^{ELLI}-1,2 ± 0,1 μM).



Obr. 5.1: Výsledky MTT testu ukazují porovnání cytotoxicity cisplatinu vůči lidským neuroblastomovým liniím UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} kultivovanými 48 hodin s cisplatinou o počáteční koncentraci 300 μM (A). Cytotoxicita ellipticinu o počáteční koncentraci 20 μM po 48 hodinách vůči lidským neuroblastomovým liniím UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} (B). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

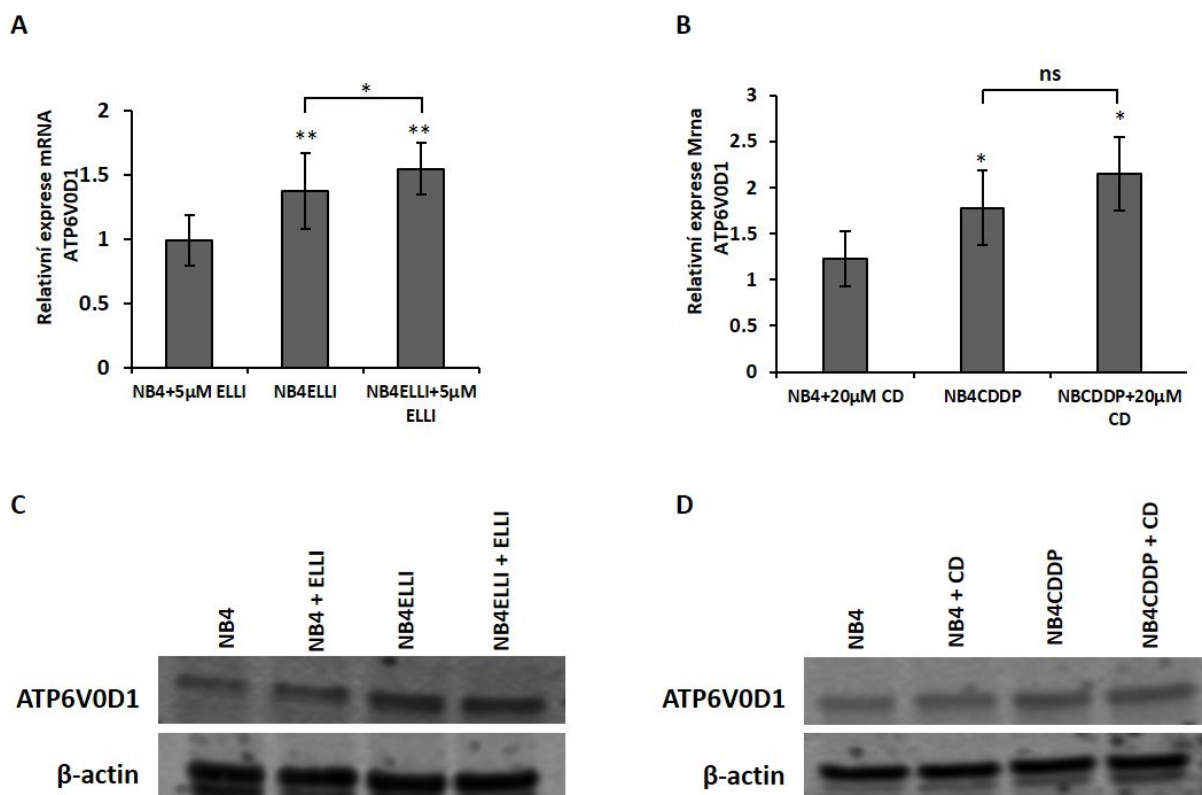
Analýza hladin mRNA v buňkách rezistentních na ellipticin odhalila významné změny v expresi několika podjednotek V-ATPázy (**Obr. 5.2**). Linie rezistentní na cisplatinu vykazovala signifikantně vyšší expresi genů podjednotek *ATP6V0D1*, *ATP6V0A1* a *ATP6V1G1* v porovnání s mateřskou linií. Expres podjednotek *ATP6V0E1* a *ATP6V0B* byla nižší. U zbylých podjednotek (*V0C*, *V1A1*, *V1B2*, *V1F*, *V1E2*, *V1D*, *V1H*, *V1A*, *V1C1*) nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna v expresi. U linie UKF-NB-4^{ELLI} jsme v porovnání s UKF-NB-4 prokázali signifikantní zvýšení ($p < 0,01$) exprese *ATP6V0D1*, kódující d podjednotku V-ATPázy. Naproti tomu jsme našli downregulaci šesti podjednotek (*V1B2*, *V1F*, *V1E2*, *V1D*, *V1H* a *V1G1*), zatímco exprese dalších šesti podjednotek (*V0A1*, *V0E1*, *V0B*, *V0C*, *V1A* a *V1C1*) byla nezměněna.



Obr. 5.2: Výsledky stanovení exprese panelu podjednotek V-ATPázy metodou qRT-PCR. Relativní exprese všech podjednotek V-ATPázy v neuroblastomové línii UKF-NB-4^{CDDP} v porovnání s UKF-NB-4 (A) a v línii UKF-NB-4^{ELLI} v porovnání s UKF-NB-4 (B). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů a data jsou vyhodnocena softwarem REST 2009. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna **, signifikance $p < 0,001$ znázorněna ***.

Na základě výsledků byla pro další zkoumání vybrána ATP6V0D1 podjednotka, která jako jediná byla zvýšená u obou rezistentních neuroblastomových linií. Testovali jsme tedy vliv cytostatik na expresi této podjednotky na úrovni mRNA. Z výsledků je patrné, že se v línii

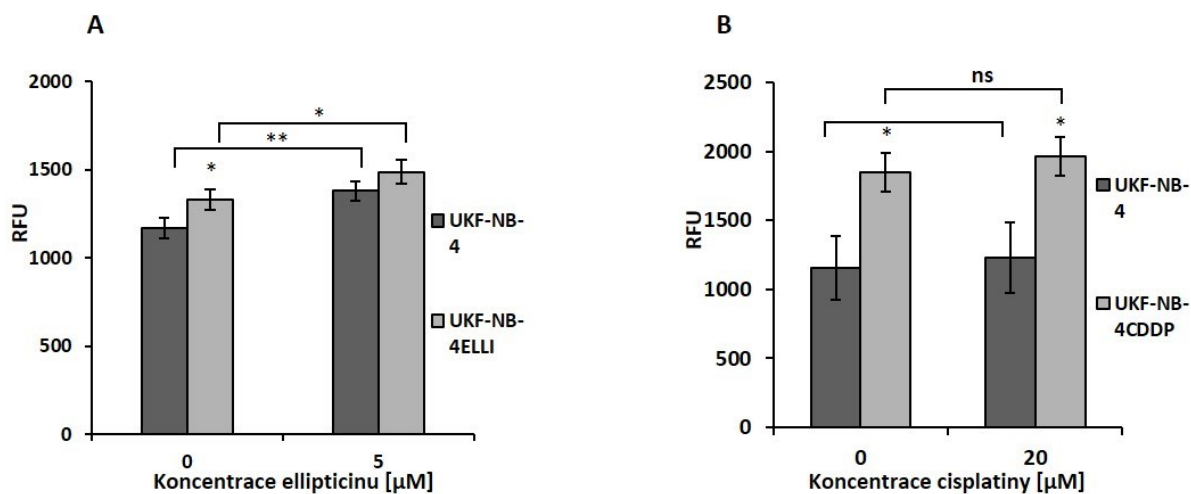
UKF NB-4^{ELLI} zvýšila exprese *ATP6V0D1* působením ellipticinu (**Obr. 5.3 A**), naproti tomu cisplatina neměla na expresi této podjednotky v UKF-NB-4^{CDDP} signifikantní vliv (**Obr. 5.3 B**). Dále jsme ověřili expresi *ATP6V0D1* podjednotky na úrovni proteinu. Výsledky Western blotu potvrzují zvýšenou expresi proteinu v obou rezistentních liniích v porovnání s mateřskou senzitivní linií a zároveň působení cytostatik tuto expresi nemění (**Obr. 5.3 C a D**).



Obr. 5.3: Výsledky vlivu testovaných cytostatik na expresi *ATP6V0D1* podjednotky V-ATPázy. Relativní exprese mRNA ověřená metodou qRT-PCR v lini UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných 24 h s 5μM ellipticinem (ELLI) (A) a lini UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} inkubovaných 24 h s 20μM cisplatinou (CD) (B). Expresa mRNA v senzitivní linii neovlivněné cytostatiky byla 1 a není v obrázku A a B znázorněna. Expresa proteinu ověřená metodou western blot v lini UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných 24 h s 5μM ellipticinem (ELLI) (C) a lini UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} inkubovaných 24 h s 20μM cisplatinou (CD) (D), β-actin sloužil jako kontrola nanášky. Reprezentativní snímky jednoho ze tří nezávislých experimentů. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů a data jsou vyhodnocena softwarem REST 2009. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna **, ns není signifikantní.

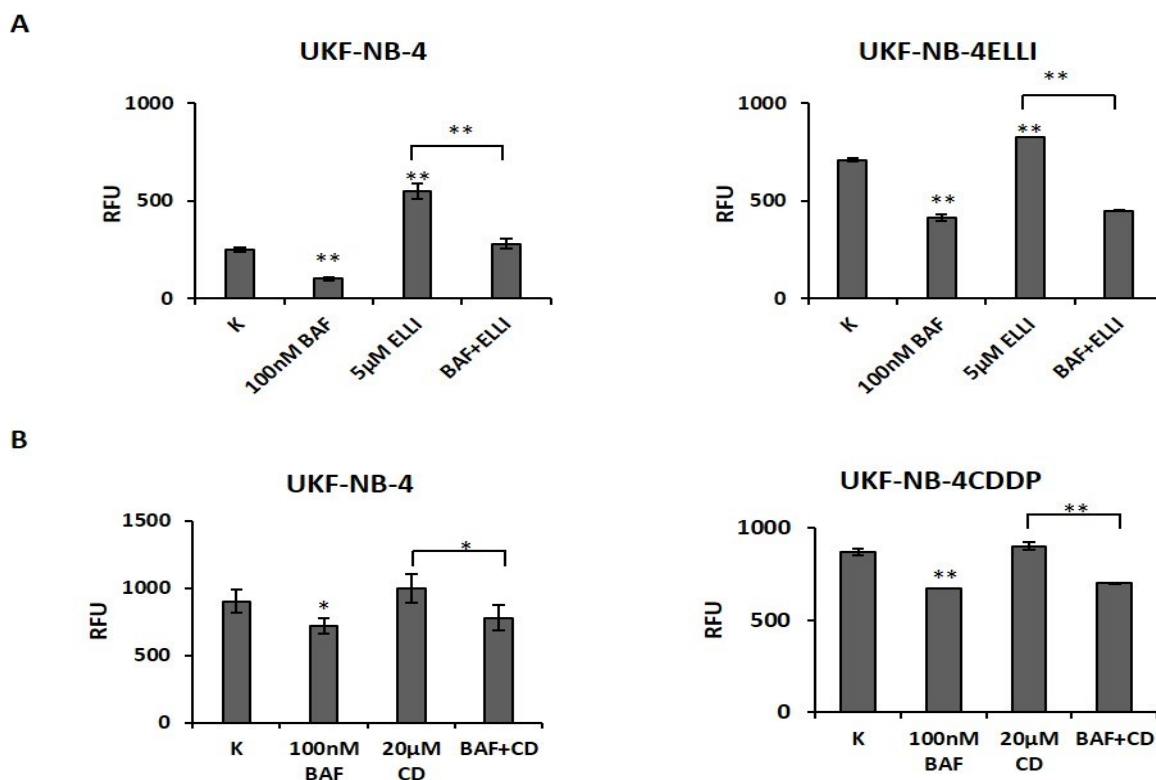
5.2 Rezistentní neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP} vykazují vyšší lyzozomální absorpci a inhibice V-ATPázy potence účinky testovaných cytostatik

Na základě našich předešlých výsledku, kdy jsme pozorovali lokalizaci ellipticinu v lyzozomech, jsme studovali lyzozomální kapacitu v NBL buňkách, k jejímuž posouzení jsme využili lyzozomově specifické barvivo LysoTracker Deep Red (LTR). Výsledky ukázaly signifikantně vyšší intenzitu fluorescence LTR jak v UKF-NB-4^{ELLI} rezistentní linii, tak v UKF-NB-4^{CDDP} v porovnání s linií senzitivní (**Obr. 5.4 A, B**). Ellipticin zvýšil vychytávání LTR do lyzozomů jak v linii senzitivní tak v rezistentní vůči ellipticinu, což naznačuje možnou zvýšenou aktivitu V-ATPázy, nicméně cisplatina neměla žádný signifikantní vliv u senzitivní ani rezistentní linie.



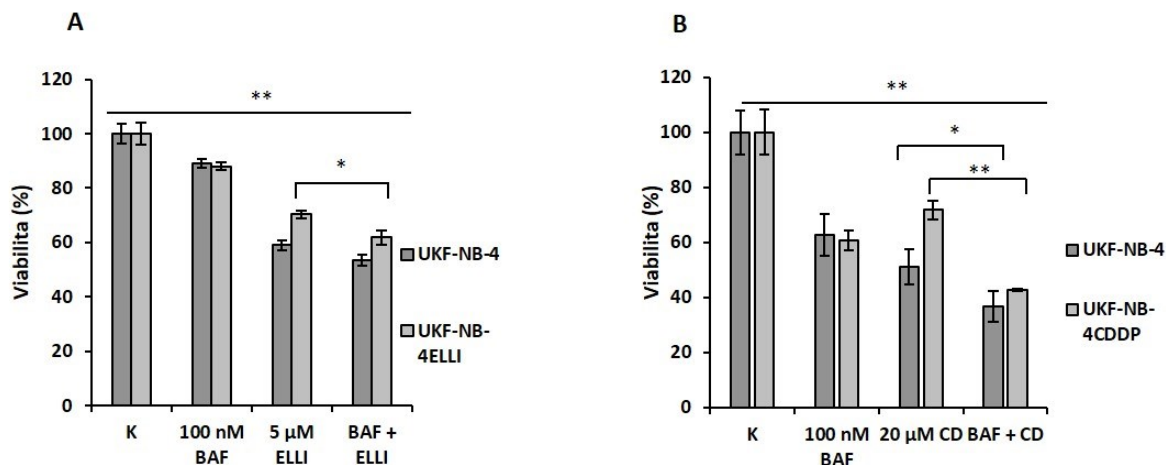
Obr. 5.4: Výsledky analýzy intenzity fluorescence představují lyzozomální vychytávání LysoTracker red (LTR) v buňkách UKF-NB-4 a v UKF-NB-4^{ELLI} kultivované bez ellipticinu nebo s 5 μM ellipticinem po dobu 24 hodin (A), UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} kultivované bez cisplatinu nebo s 20 μM cisplatinou po dobu 24 hodin (B) a následně 50 nM LTR po dobu 30 minut. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna **, (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

Pro potvrzení našeho předpokladu byly buňky ošetřeny inhibitorem V-ATPázy bafilomycinem A nebo jeho kombinací s příslušným cytostatikem. Ošetření bafilomycinem vedlo ke snížení intenzity fluorescence LTR ve všech liniích (UKF-NB-4, UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP}) a zároveň potlačení zvýšení lyzozomální kapacity indukovaného ellipticinem v buněčných liniích UKF-NB-4, UKF-NB-4^{ELLI} (**Obr. 5.5**).



Obr. 5.5: Výsledky analýzy intenzity fluorescence představují lyzozomální vychytávání *LysoTracker red* (LTR) v buňkách UKF-NB-4 a v UKF-NB-4^{ELLI} po kultivaci s 100nM bafilomycinem A (BAF), 5μM ellipticinem (ELLI), jejich kombinací (BAF+ELLI) nebo bez přídavku (K) po dobu 30 minut a následně 50 nM LTR po dobu 30 minut (A). Vychytávání LTR v UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} po kultivaci s 100nM bafilomycinem A (BAF), 20μM cisplatinou (CD), jejich kombinací (BAF+CD) nebo bez přídavku (K) po dobu 30 min a následně 50 nM LTR po dobu 30 minut (B). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna ** (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

Dalším cílem bylo zjistit, zda inhibice V-ATPázy zvýší citlivost k vybraným cytostatikům a které cytotoxické látky jsou potencovány, případně inhibovány inhibitory V-ATPázy. Pro celkovou inhibici V-ATPázy byl použit výše zmíněný specifický inhibitor bafilomycin A. Výsledky měření viability pomocí PrestoBlue Cell Viability Reagent jsou uvedeny na **Obr. 5.6**. Linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} byly vystaveny působení 5 μ M ellipticinu, 100nM bafilomycinu A nebo jejich kombinaci po dobu 24 hodin. Samotný bafilomycin A snížil viabilitu u obou linií stejně. U senzitivní linie došlo ke snížení viability jak po inkubaci se samotným ellipticinem, tak v kombinaci s inhibitorem, nicméně mezi těmito situacemi nebyl signifikantní rozdíl. Naopak u rezistentní line UKF-NB-4^{ELLI} došlo k signifikantnímu poklesu viability při kombinaci bafilomycinu A a ellipticinu oproti samotnému ellipticinu (**Obr. 5.6 A**). Analogické výsledky byly pozorovány i u linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} inkubovanými 24 hodin s 20 μ M cisplatinou, 100nM bafilomycinem A nebo jejich kombinací, která ovšem signifikantně snížila viabilitu u obou linií oproti samotné cisplatině (**Obr. 5.6 B**). Z těchto výsledků vyplývá, že bafilomycin A potencuje cytotoxický účinek jak ellipticinu, tak cisplatinu a navíc kombinované ošetření inhibitorem V-ATPázy a cytostatiky signifikantně zvýšilo citlivost rezistentních buněčných linií k těmto cytostatikům.

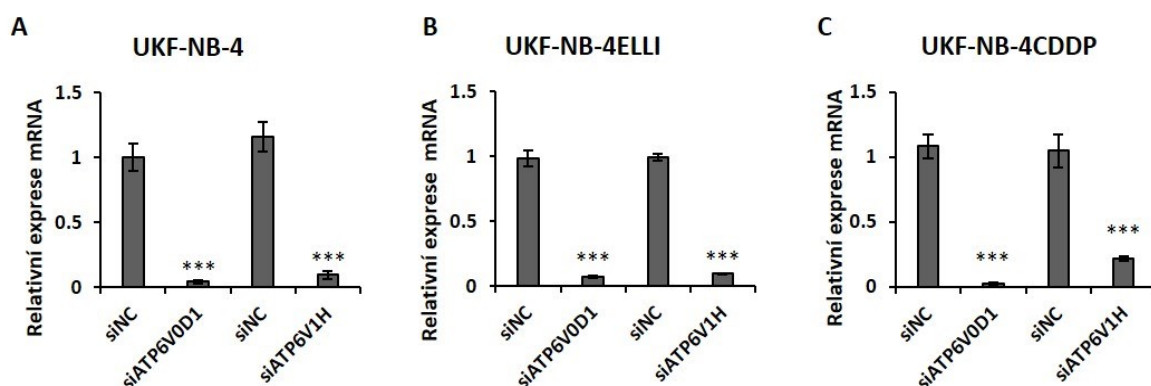


Obr. 5.6: Výsledky měření buněčné viability pomocí PrestoBlue Cell Viability Reagent. Vaibilita buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných s 100nM bafilomycinem A (BAF), 5μM ellipticinem (ELLI), jejich kombinací (BAF+ELLI) nebo bez přídavku (K) po dobu 24 hodin (A). Vaibilita buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} inkubovaných s 100nM bafilomycinem A (BAF), 20μM cisplatinou (CD), jejich kombinací (BAF+CD) nebo bez přídavku (K) po dobu 24 hodin (B). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna ** (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

5.3 Zavedení a ověření úspěšnosti transfekce siRNA proti ATP6V0D1 a ATP6V1H

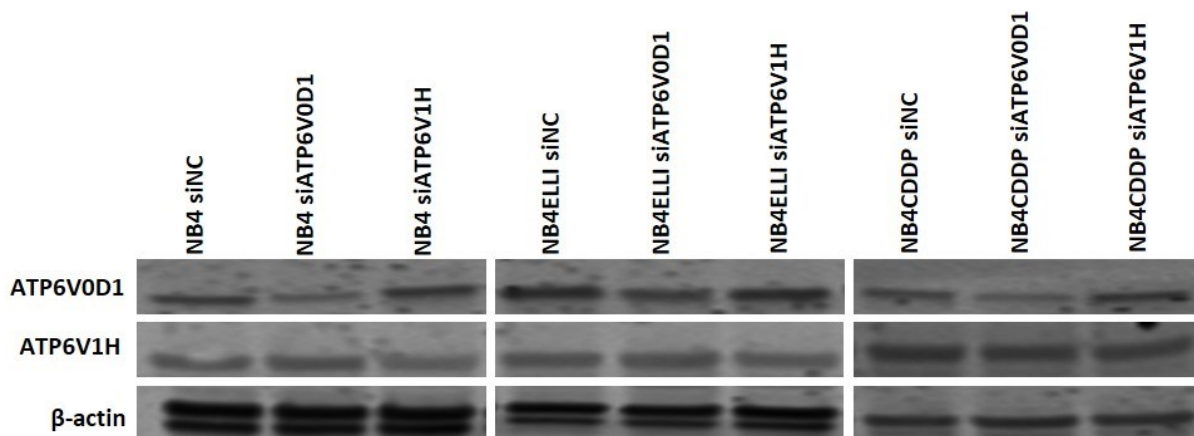
Vzhledem k tomu, že inhibice V-ATPázy bafilomycinem A zvýšila citlivost rezistentních buněčných linií UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP} k příslušným cytostatikům, zaměřili jsme se na objasnění role podjednotky ATP6V0D1, která je v obou liniích zvýšeně exprimována. Pro zjištění jejího vlivu na chemorezistenci jsme provedli specifickou inhibici této podjednotky pomocí 10 nM siRNA cílené na ATP6V0D1 (48hodinová transfekce). Pro srovnání byla provedena inhibice podjednotky ATP6V1H a jako negativní kontrola sloužila nekódující siRNA siNC. Úspěšnost transfekce, byla ověřena pomocí qRT-PCR a relativní exprese genů ATP6V0D1 a ATP6V1H vztažena k netransfekovaným buňkám je zobrazena na **Obr. 5.7**. Z grafů je patrné signifikantní snížení exprese obou podjednotek v liniích UKF-NB-4,

UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP} po zavedení příslušných siRNA. Zavedení siNC nemělo podle očekávání na tuto expresi vliv.



Obr. 5.7: Výsledky ověření úspěšnosti transfekce pomocí qRT-PCR. Exprese genu *ATP6V0D1* a *ATP6V1H* V-ATPázy v UKF-NB-4 (A) UKF-NB-4^{ELLI} (B) a UKF-NB-4^{CDDP} (C) transfekované molekulami 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H po dobu 48 hodin. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů a data jsou vyhodnocena softwarem REST 2009. Signifikance $p < 0,001$ znázorněna ***.

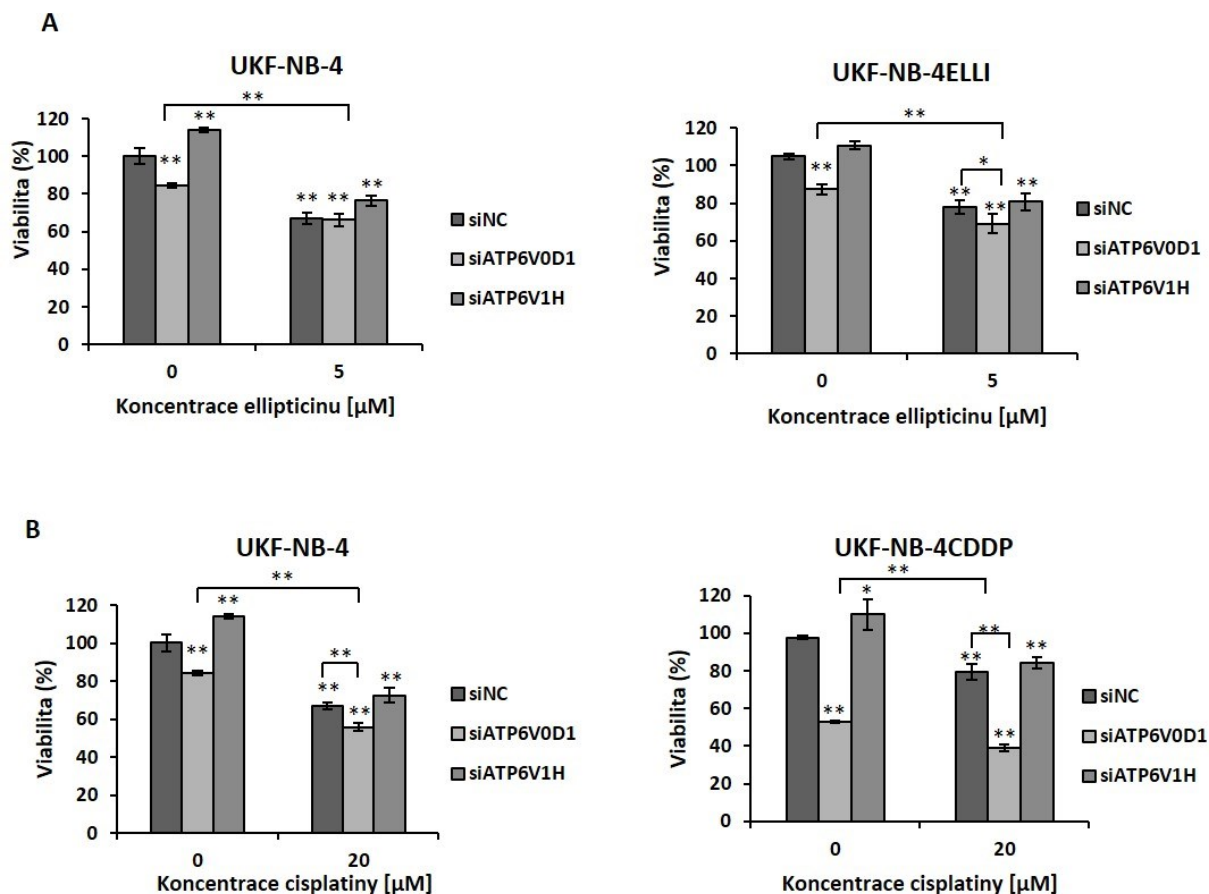
Dále byla úspěšnost umlčení zkoumaných genů ověřena na úrovni proteinů metodou Western blot. Snímky membrán ukazují výsledky (Obr. 5.8), které jsou ve shodě s výsledky získanými metodou qRT-PCR, kdy transfekce vedla k významné supresi obou podjednotek V-ATPázy, tedy úspěšnému umlčení.



Obr. 5.8: Výsledky ověření úspěšnosti transfekce metodou Western blot. Expresu proteinu ATP6V0D1 a ATP96V1H V-ATPázy v UKF-NB-4, UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP} transfekovaných 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siTP6V1H po dobu 48 hodin. Jako kontrola rovnoměrného množství proteinu ve všech vzorcích byl použit aktin. Reprezentativní snímek membrán jednoho ze tří nezávislých experimentů (biologického triplikátu).

5.4 Umlčení ATP6V0D1 podjednotky V-ATPázy potencuje cytotoxicitu testovaných cytostatik a inhibuje proliferaci neuroblastomových buněčných linií

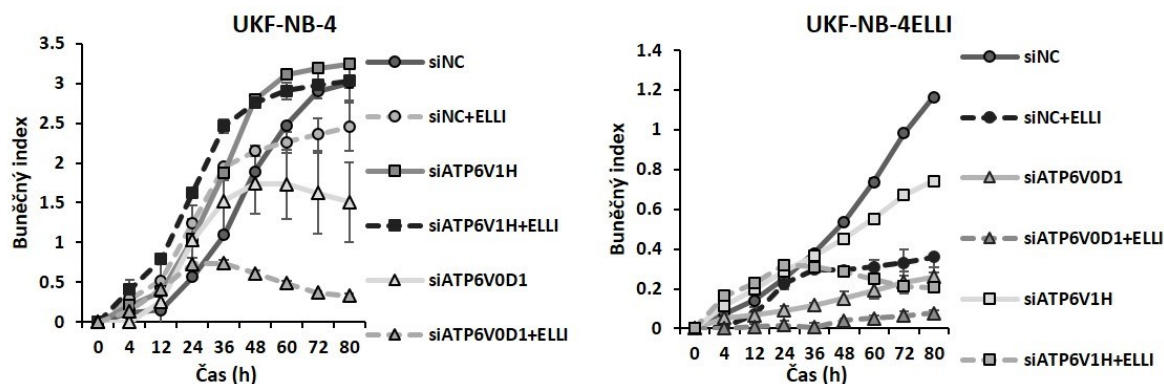
Výsledky testu buněčné viability po transfekci siRNA prokázaly signifikantní snížení počtu životaschopných buněk po umlčení ATP6V0D1 podjednotky u všech buněčných linií NBL, zatímco siATP6V1H neměla na životaschopnost buněk významný vliv. Následné ošetření příslušnými cytostatiky po transfekci výrazně snížilo životaschopnost jak senzitivních, tak rezistentních buněk UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP} transfekovaných siRNA ATP6V0D1, zatímco životaschopnost buněk tranfekovaných siTAP6V1H zůstala ve srovnání s kontrolou (siNC) nezměněna (**Obr. 5.9**).



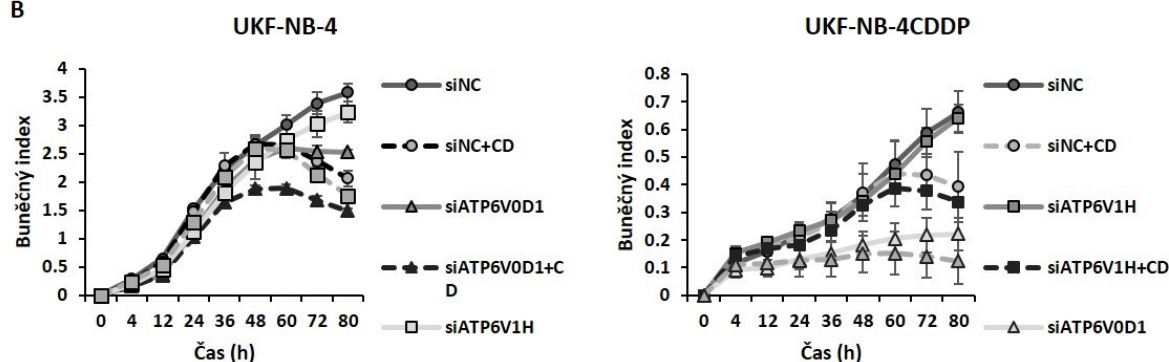
Obr. 5.9: Výsledky měření buněčné viability pomocí PrestoBlue Cell Viability Reagent. Viability buněk UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} transfekovaných 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H po dobu 48 hodin a následně inkubované s 5 μ M ellipticinem nebo bez něj po dobu 24 hodin (A), UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} transfekovaných 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H po dobu 48 hodin a následně inkubované s 20 μ M cisplatinou nebo bez ní po dobu 24 hodin (B). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna ** (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

Umlčení podjednotky ATP6V0D1 významně inhibovalo buněčnou proliferaci u všech NBL linií, měřeno pomocí systému xCELLigence. Tyto buňky byly zároveň nejcitlivější na ošetření cytostatiky. Naopak umlčení ATP6V1H nemělo na proliferaci vliv (**Obr. 5.10**)

A



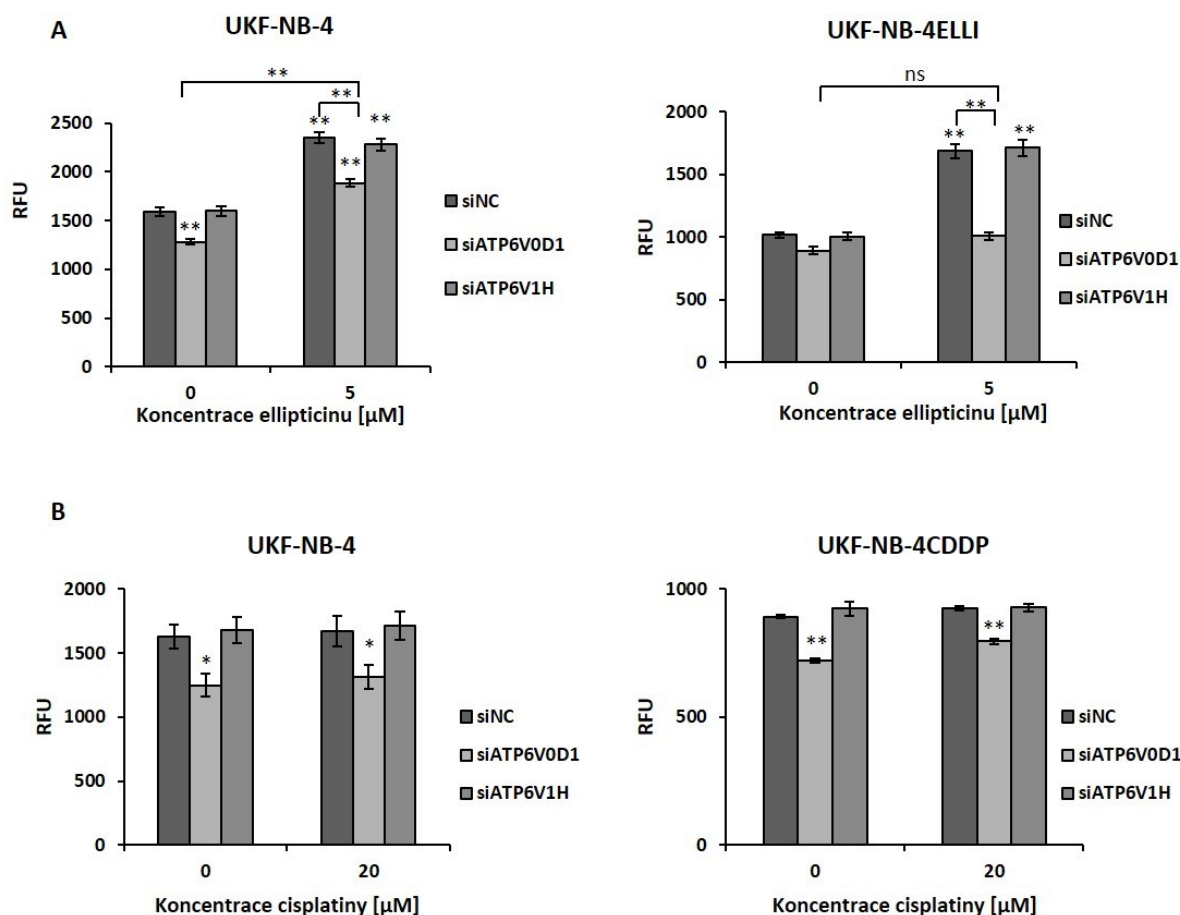
B



Obr. 5.10: Výsledky měření buněčné proliferace pomocí systému XCelligence. Grafy znázorňující vývoj proliferace po transfekci molekulami 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H a následném ošetření buněk UKF-NB-4 a UKF-NB4ELLI 5 μ M ellipticinem (A) a UKF-NB-4 a UKF-NB-4CDDP 20 μ M cisplatinou (B). Reprezentativní data jednoho ze tří nezávislých experimentů.

V souladu s účinky inhibitoru V-ATPázy bafilomycinu A, knockdown podjednotky ATP6V0D1 snížil intenzitu fluorescence LTR v buňkách UKF-NB-4, a to jak po ošetření ellipticinem, tak bez něj. U rezistentní buněčné linie UKF-NB-4^{ELLI} nedošlo k významnému snížení fluorescence LTR; avšak umlčení ATP6V0D1 udrželo intenzitu fluorescence LTR na úrovni srovnatelné s neošetřenou kontrolou i po expozici ellipticinu (**Obr. 5.11 A**). U linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} jsou výsledky srovnatelné, u obou došlo po zavedení siATP6V0D1 ke snížení intenzity fluorescence LTR a to jak u kontrol, tak i po inkubaci s 20 μ M cisplatinou. Cisplatina však neměla na změnu intenzity žádný vliv u senzitivní ani rezistentní linie

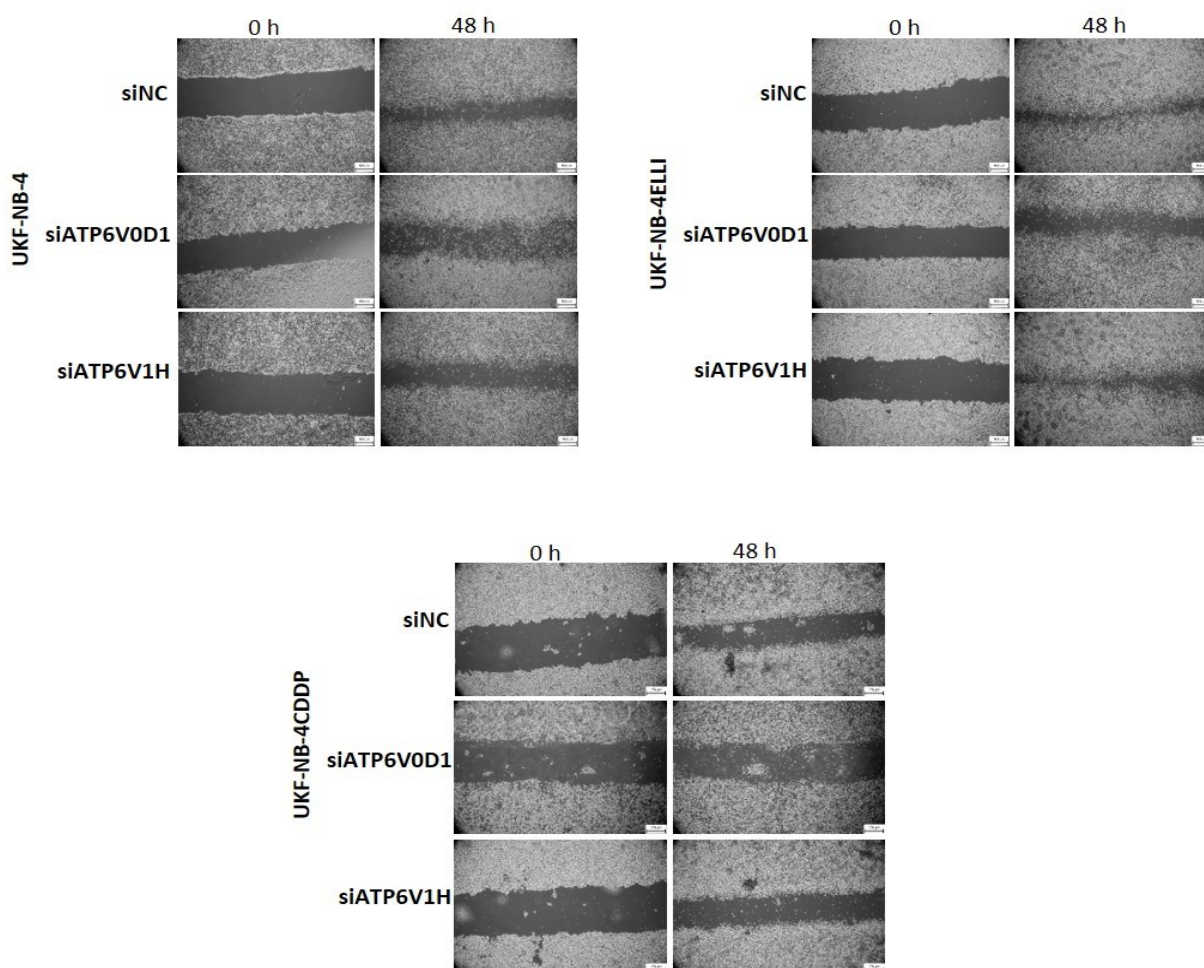
(Obr. 5.11 B). Knockdown podjednotky ATP6V1H neovlivnil fluorescenci LTR ve srovnání s kontrolou v žádné z buněčných linií ani po inkubaci s cytostatiky (Obr. 5.11).



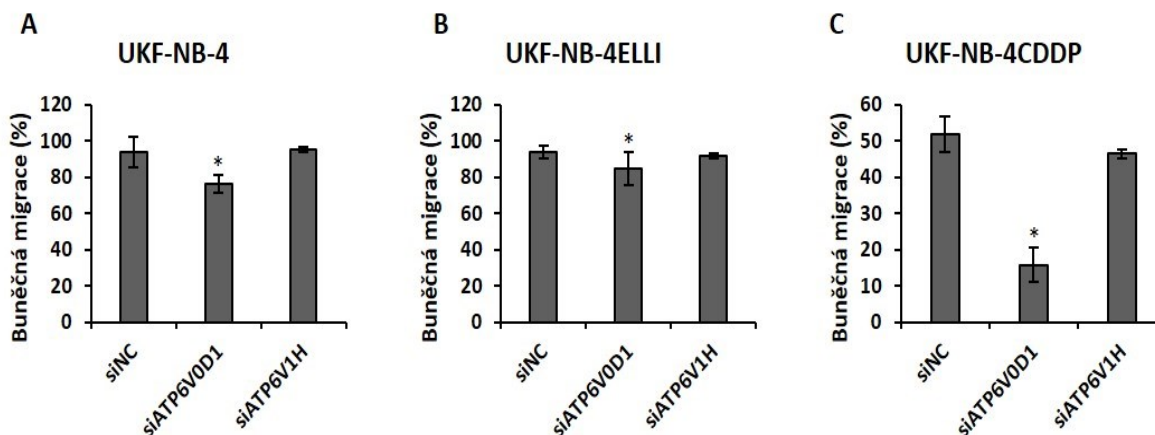
Obr. 5.11: Výsledky analýzy intenzity fluorescence představují lyzozomální vychytávání LysoTracker red (LTR) v buňkách UKF-NB-4 a v UKF-NB-4^{ELLI} transfekovaných 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H po dobu 48 hodin a následně ošetřené 5 μ M ellipticinem po dobu 30 minut nebo bez cytostatika (A), UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} transfekovaných 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H po dobu 48 hodin a následně ošetřené 20 μ M cisplatinou po dobu 30 minut nebo bez cytostatika (B) a poté 50 nM LTR po dobu 30 minut. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna **, ns není signifikantní. (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

5.5 Umlčení ATP6V0D1 podjednotky V-ATPázy inhibuje buněčnou migraci a vede k zástavě buněčného cyklu

Vzhledem k tomu, že downregulace podjednotky ATP6V0D1 V-ATPázy inhibovala buněčnou proliferaci, zkoumali jsme vliv jejího umlčení na migraci a buněčný cyklus. V souladu s výsledky testu proliferace vykazoval test hojení ran (wound-healing assay) významně sníženou migraci buněk po knockdownu podjednotky ATP6V0D1 u všech linií, zatímco knockdown podjednotky ATP6V1H neměl žádný vliv na senzitivní ani rezistentní buněčné linie NBL (**Obr. 5.12 a 5.13**).

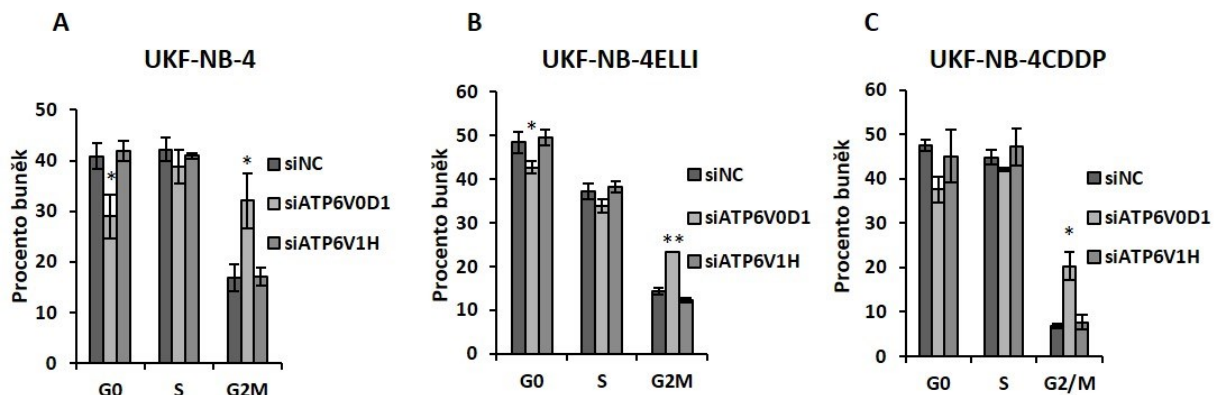


Obr. 5.12: Snímky testu hojení ran “wound-healing assay”. Reprezentativní snímky jednoho ze tří nezávislých experimentů transfekovaných buněk 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H po dobu 48 hodin UKF-NB-4, UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP} pořízené okamžitě a 48 hodin od „poranění“.



Obr. 5.13: Výsledky analýzy migrace buněk metodou “wound-healing assay”. Procentuální uzavření bezbuněčné rýhy (rány) transfekovaných buněk 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H po dobu 48 hodin po 48 hodinách od „poranění“ pro buněčnou linii UKF-NB-4 (A), UKF-NB-4^{ELLI} (B) a UKF-NB-4^{CDDP} (C). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů a data jsou vyhodnocena pomocí program ImageJ. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna * (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

Průtoková cytometrie, použitá ke studiu distribuce buněčného cyklu, odhalila významný nárůst podílu buněk ve fázi G2/M ve všech buněčných liniích (UKF-NB-4, UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP}) po transfekci siRNA ATP6V0D1 ve srovnání s kontrolní skupinou (Obr. 5.14). Umlčení ATP6V1H nevedlo k žádným významným změnám v buněčném cyklu.



Obr. 5.14: Výsledky analýzy buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Procentuální distribuce fází buněčného cyklu transfekovaných buněk 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H po dobu 48 hodin pro buněčnou linii UKF-NB-4 (A), UKF-NB-4^{ELLI} (B) a UKF-NB-4^{CDDP} (C). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna * (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

5.6 Průkaz exprese ATP6V0D1 ve vzorcích nádorů

V rámci této studie jsme se dále zaměřili na průkaz exprese podjednotky ATP6V0D1 ve vzorcích neuroblastomů od pacientů. Od každého pacienta byly k dispozici 2 až 3 vzorky tumorů odebrané v různém čase. Celkem bylo vyšetřeno 24 vzorků neuroblastomu získaných od 10 pacientů, přičemž 2 vzorky od jednoho pacienta byly nehodnotitelné vzhledem k poškození vzorků v době odběru a transportu do naší laboratoře.

Naše nálezy, uvedené v **Tab. 5.1**, získané ze vzorků nádorů od pacientů s neuroblastomem, kteří podstoupili opakované chirurgické zákroky v průběhu vývoje onemocnění, podporují experimentální data naznačující významnou roli exprese ATP6V0D1 ve vývoji rezistence vůči cisplatině. U většiny pacientů léčených podle protokolu pro HR-NBL vzorky odebrané během léčby nebo po jejím ukončení vykazovaly zvýšení exprese ATP6V0D1 oproti nálezu ve vzorku získaném před zahájením terapie. Tento protokol zahrnuje opakované podávání vysokých dávek cisplatiny. Výjimku tvořil pacient 3 (vzorek 3), u kterého byl detekován pouze malý počet nádorových buněk, pravděpodobně v důsledku chemoterapie, a pacient 9. U recidiv vzniklých během nebo po chemoterapii lze předpokládat rezistenci vůči

použitým cytostatikům. U pacientů léčených podle protokolů pro nízké a střední riziko není cisplatina součástí léčebného režimu a pouze v některých případech je podávána carboplatina v kombinaci s etoposidem, což se však netýkalo pacienta 1 ani 8.

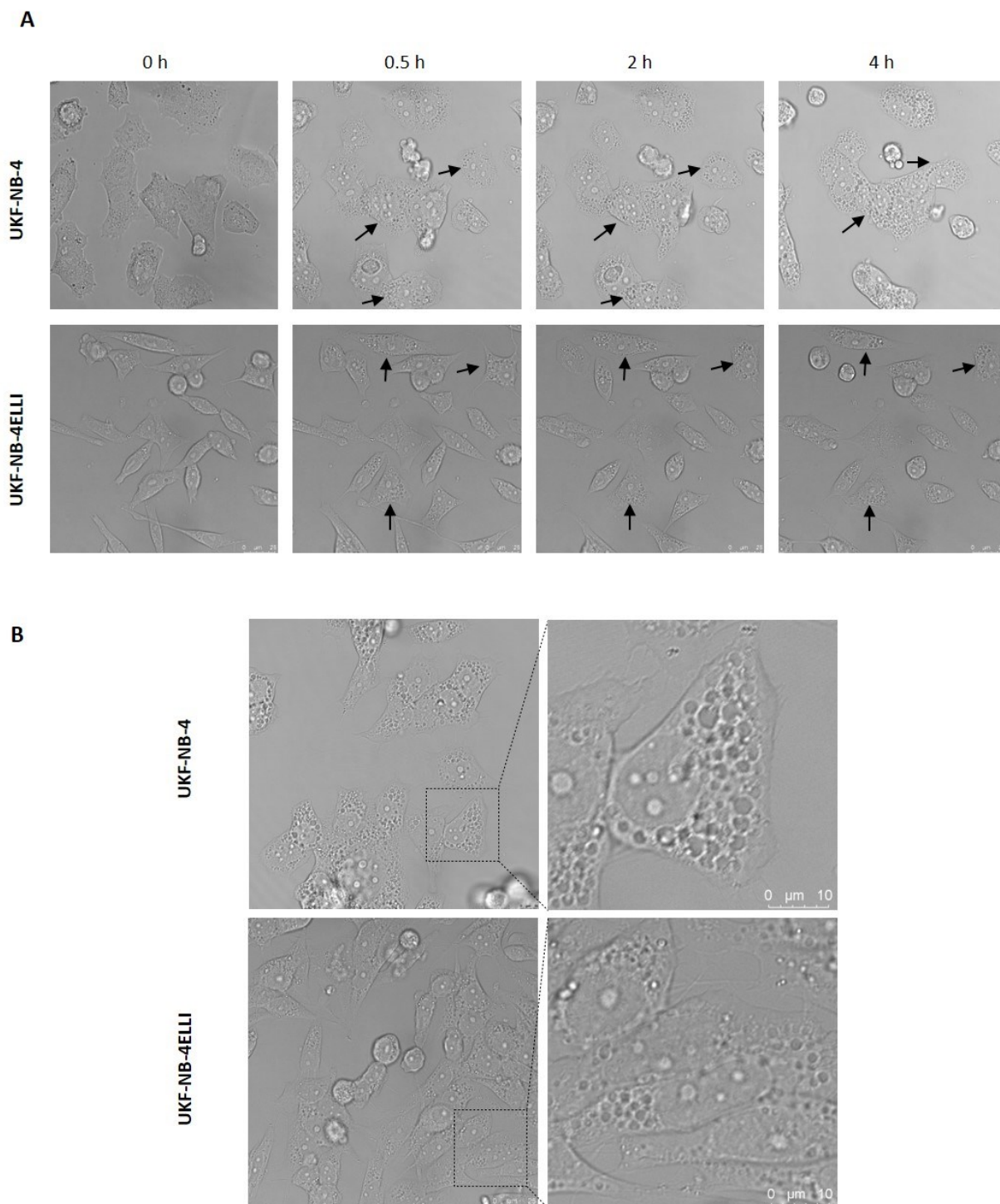
Vzhledem k omezenému počtu analyzovaných pacientů a heterogenitě doby odběru vzorků nebylo možné provést statistické vyhodnocení.

Tab. 5.1: Relativní exprese ATP6V0D1 ve vzorcích neuroblastomů získaných od pacientů v průběhu vývoje onemocnění. Analýza zahrnuje klinické charakteristiky pacientů: stadium onemocnění podle INRGSS (INR), stav genu MYCN (NA - není amplifikován, AMP - amplifikace genu MYCN), typ chemoterapie - Chemot (L/I - podle protokolu “Low and Intermediate risk neuroblastoma study”, HR - podle protokolu “High risk neuroblastoma study”) a stav pacienta ke dni ukončení studie - Osud (CR - kompletní remise, PD - progredující onemocnění, DD - zemřel na progresi neuroblastomu). Relativní exprese ATP6V0D1 je porovnávána s prvním vyšetřením - tam je vždy hodnota 1. Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou (*), přičemž hodnoty >1 indikují vyšší expresi a hodnoty <1 nižší expresi v porovnání s prvním vyšetřením.

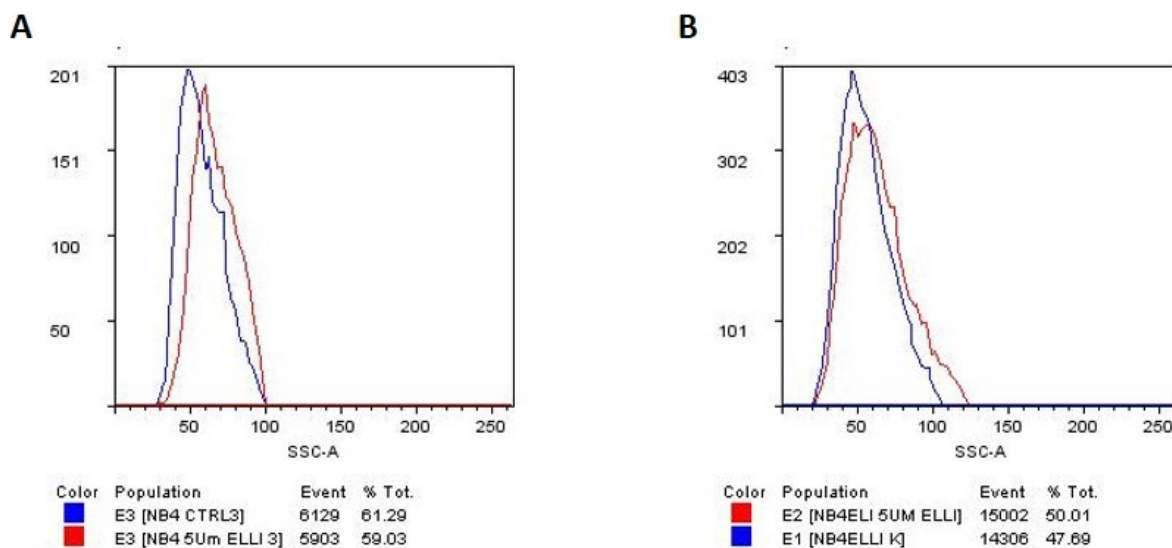
č	INR/ MYCN	1.vz.		2.vz		3.vz		Osud
1	L2/ NA	Vstupní biopsie	1	Recidiva na L/I chemot	0,12*	/	/	PD
2	L2/ NA	Vstupní operace	1	Meta po HR chemot	3,48*	/	/	CR
3	M/ AMP	Vstupní biopsie	1	Progrese na HR chemot	1,23*	Progrese při chemot	0,774*	DD
4	M/NA	Vstupní operace	1	Recidiva po HR chemot	1,277*	Biopsie po chemot	3,37*	DD
5	M/ AMP	Vstupní biopsie	1	Oper po chemot	1,59*	Operace relaps po 2. chemot	1,04	DD
6	M/NA	Operace recidiva po HR chemot	1	Biopsie nové ložisko	0,186*	Operace 2. recidiva	0,269*	DD
7	M/NA	Vstupní biopsie	1	Oper po HR chemot	1,724*	/	/	CR
8	L2/NA	Operace po L/I chemot	1	Biopsie recidiva	0,958	/	/	DD
9	M/NA	Vstupní biopsie	1	Biopsie nové ložisko po HR chemot	0,850			PD

5.7 Utláčení ATP6V0D1 podjednotky V-ATPázy snížilo ellipticinem indukovanou tvorbu vakuol v buněčných liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}

V následujících experimentech jsme využili fluorescenčních vlastností ellipticinu, které umožňují jeho detekci a sledování v buňkách a tkáních. Ellipticin, jako slabá báze, se přednostně akumuluje v lyzozomech díky gradientu pH, zatímco jeho hydrofobicita v neutrálním nebo zásaditém prostředí mu umožňuje pronikat přes buněčné membrány. Na základě dříve popsaného vstupu ellipticinu do lyzozomů a související vakuolizace jsme zkoumali vliv utláčení podjednotky ATP6V0D1 na tento proces (Hrabeta et al. 2015). Pozorování buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} konfokálním mikroskopem ukázala, že ellipticin v koncentraci 5 μ M indukuje masivní cytoplazmatickou vakuolizaci již po 30 minutách (**Obr. 5. 15**). Tyto výsledky, jsme si potvrdili pomocí průtokové cytometrie, kde byla rovněž u obou linií po vystavení ellipticinu zaznamenána změna morfologie buněk hodnocená pomocí rozptylu světla (tzv. side scatter) (**Obr. 5.16**).

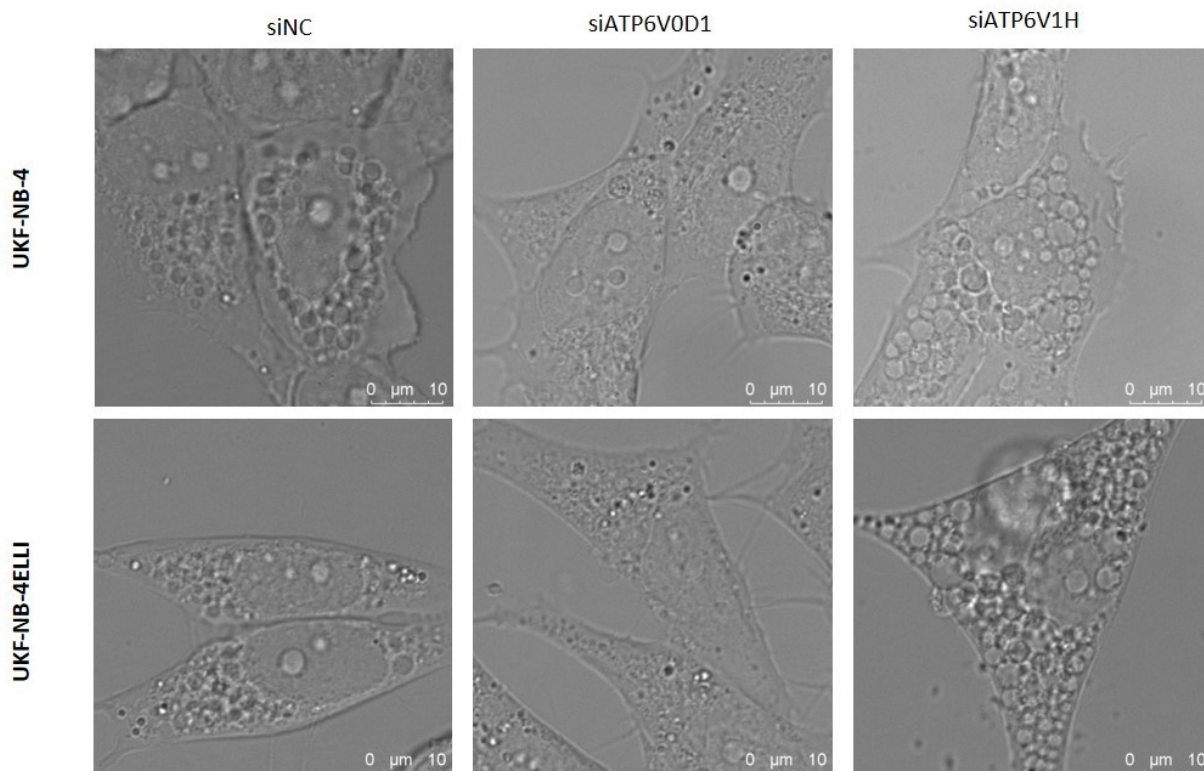


Obr. 5.15: Snímky z konfokálního mikroskopu. Reprezentativní snímky jednoho ze tří nezávislých experimentů buněk UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných s 5 μ M ellipticinem, pořízené v různých časových bodech 0-4 hodiny (A) a po 4 hodinách (B). Šipky ukazují na buňky, v nichž se formují vakuoly. Zvětšení 630x.



Obr. 5.16 Výsledky průtokové cytometrie- rozptyl světla. Reprezentativní data jednoho ze tří nezávislých experimentů zobrazující změnu morfologie u senzitivní linie UKF-NB-4 (A) a linie rezistentní k ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} (B) po působení ellipticinu po dobu 4 hodin (červěně) a neošetřené (modře).

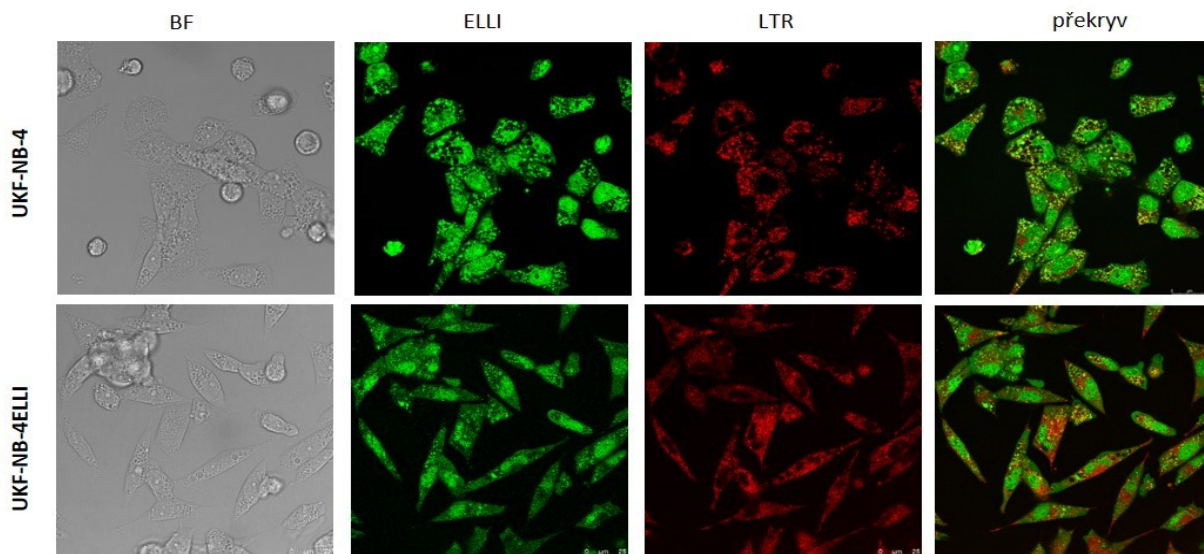
Za účelem zjištění role podjednotky ATP6V0D1 v procesu tvorby vakuol indukovaných ellipticinem jsme provedli snížení exprese této podjednotky pomocí siRNA. Z výsledků prezentovaných na **Obr. 5.17** je patrné, že knockdown ATP6V0D1 vedl k potlačení, resp. k úplnému vymizení tvorby těchto vakuol u buněčných linií, a to jak u ellipticinu senzitivní, tak i rezistentní. Naopak umlčení exprese podjednotky ATP6V1H V-ATPázy neprokázalo žádný vliv na tvorbu vakuol.



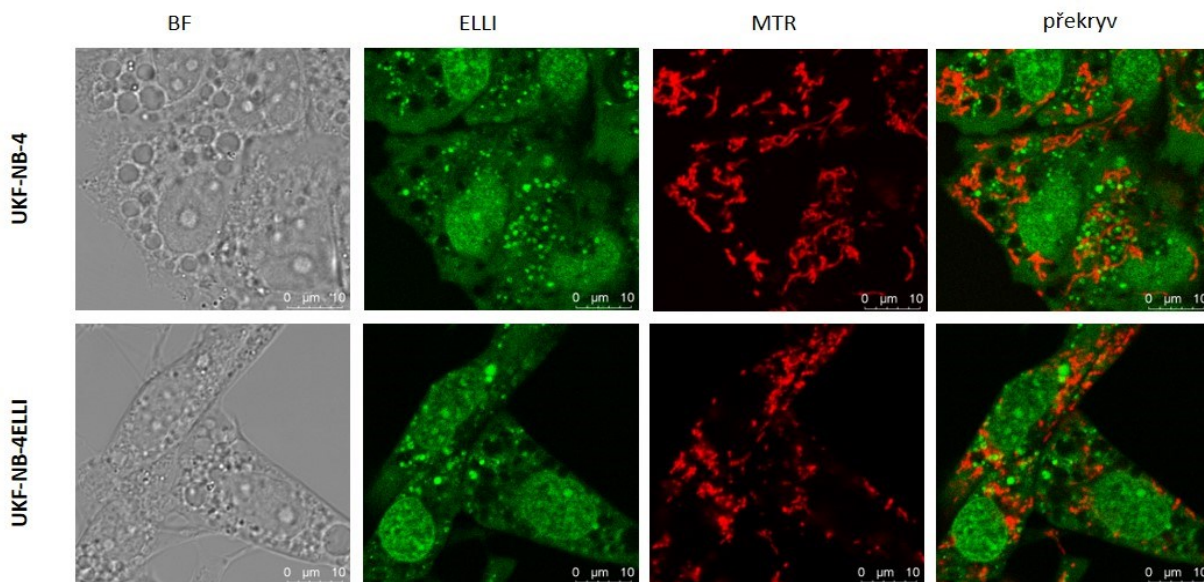
Obr. 5.17: Snímky z konfokálního mikroskopu. Reprezentativní snímky jednoho ze tří nezávislých experimentů zobrazující buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} transfekované 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siATP6V1H po dobu 48 hodin a následně inkubované 4 hodiny s 5 μM ellipticinem.

5.8 Zjištění původu ellipticinem indukovaných vakuol v liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}

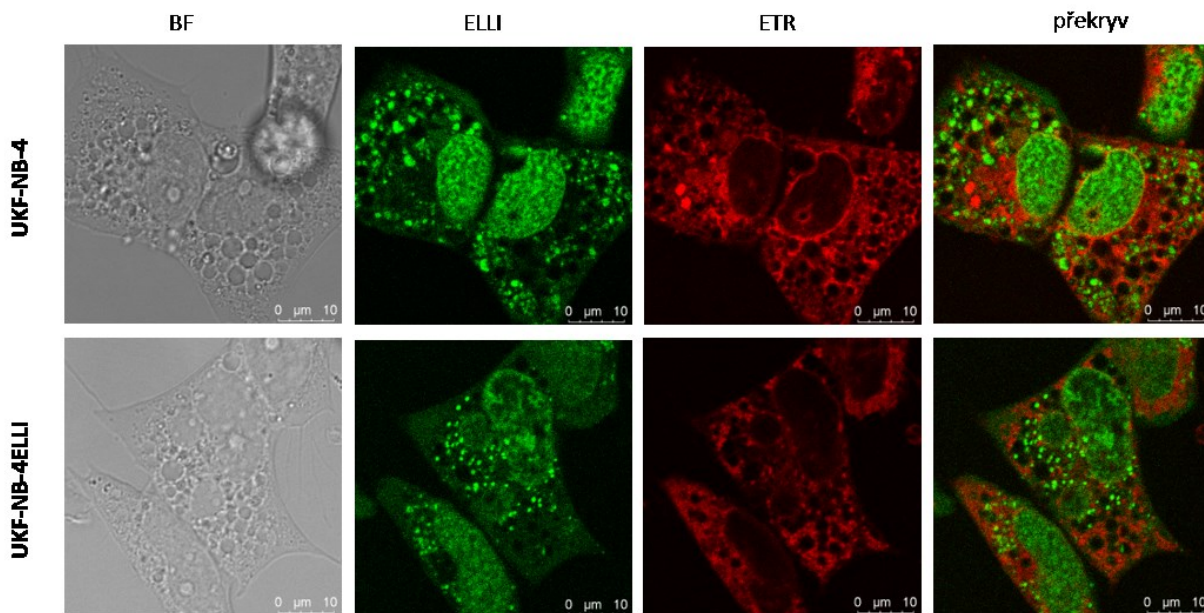
K identifikaci původu ellipticinem indukovaných vakuol jsme využili mitochondriální barvení pomocí Mito Tracker Deep Red-FM (MTR), barvení endoplazmatického retikula pomocí ER-Tracker Red (ETR) a lyzozomální barvení pomocí LysoTracker Deep Red (LTR). Výsledky ukázaly, že ellipticin se lokalizuje v lyzosomech (kolokalizace s LTR, **Obr. 5.18**). Vakuoly indukované ellipticinem nevykazovaly kolokalizaci s Mitotracker Deep Red (**Obr. 5.19**) ani LTR, ale kolokalizovaly s ETR (**Obr. 5.20**), což naznačuje, že tyto vakuoly pocházejí z endoplazmatického retikula (ER).



Obr. 5.18: Snímky z konfokálního mikroskopu. Buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} ošetřené 5 μ M ellipticinem (ELLI), 25 nM Lysotracker Deep Red (LTR) po dobu 4 hodin. Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů ukazuje lokalizaci ellipticinu (zelená) a LTR (červená), překryv znázorňuje kolokalizaci LTR s ellipticinem (žluté body), nikoli však s nově vzniklými vakuolami.



Obr. 5.19: Snímky z konfokálního mikroskopu. Buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} ošetřené 5 μ M ellipticinem (ELLI), 25 nM MitoTracker Deep Red FM (MTR) po dobu 4 hodin. Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů ukazuje lokalizaci ellipticinu (zelená) a MTR (červená), překryv neukazuje žádnou kolokalizaci MTR ani s ellipticinem ani s nově vzniklými vakuolami.



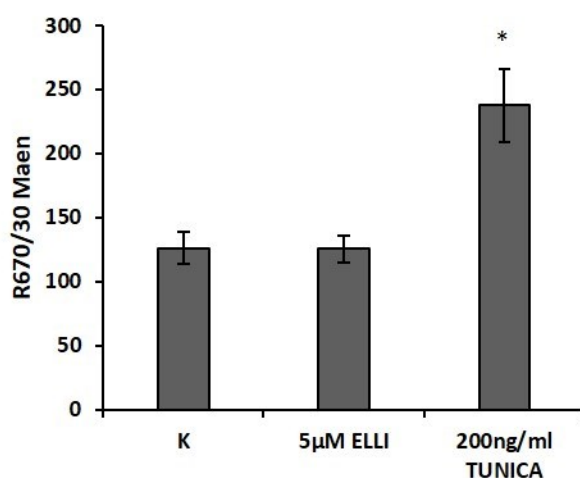
Obr. 5.20: Snímky z konfokálního mikroskopu. Buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} ošetřené 5 μ M ellipticinem (ELLI), 1 μ M ER-Tracker Red (ETR) po dobu 4 hodin. Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů ukazuje lokalizaci ellipticinu (zelená) a ETR (červená), překryv ukazuje kolokalizaci ETR s nově vzniklými vakuolami, nikoliv s ellipticinem.

5.9 UPR dráha se nepodílí na ellipticinem indukované vakuolizaci

Otok endoplazmatického retikula (ER) v důsledku ER stresu je často spojován s paraptózou, typem programované buněčné smrti. Zkoumali jsme proto, zda ellipticin indukuje paraptózu, což je proces charakterizovaný akumulací nově syntetizovaných, chybně poskládaných proteinů. Tato akumulace spouští Unfolded Protein Response (UPR), adaptivní mechanismus iniciovaný receptory stresu v membráně ER, který se snaží obnovit správnou funkci ER. Během UPR dochází k upregulaci chaperonového proteinu BiP, což zvyšuje kapacitu ER pro skládání proteinů. Současně je autofosforylována kináza PERK (pPERK), která dočasně zastavuje iniciaci translace, aby se buňka mohla vypořádat s nesprávně poskládanými proteiny. Dále je během paraptózy downregulován protein Alix, který za normálních okolností působí jako inhibitor paraptózy indukujících proteinů. Interaguje s klíčovými proteiny zapojenými do paraptózy, jako je protein kináza C, a zabraňuje jejich aktivaci (Mi et al. 2017; Sperandio et al. 2004; 2000; Hanson et al. 2023; Bell et al. 2016). Vzhledem k možné souvislosti ER stresu a

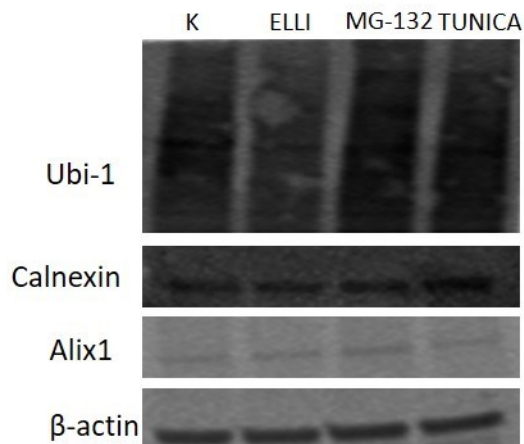
paraptózy s ellipticinem indukovanou vakuolizací jsme se rozhodli tyto procesy blíže prozkoumat.

Jako pozitivní kontrolu jsme použili buňky ošetřené tunicamycinem, který indukuje ER stres akumulací nesprávně poskládaných proteinů v ER, což vede k ER stresu a aktivaci signální dráhy UPR. Průtoková cytometrie potvrdila zvýšení exprese proteinu BiP po léčbě tunicamycinem, ale nikoli po léčbě ellipticinem v porovnání s kontrolními neošetřenými buňkami (**Obr. 5.21**).

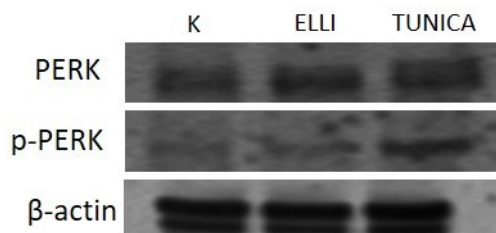


Obr. 5.21: Výsledky stanovení exprese proteinu *Bip* průtokovým cytometrem v UKF-NB-4 inkubované s 5 μM ellipticinem (ELLI), 200 ng/ml tunicamycinem (TUNICA) a neošetřenými (K). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů a data jsou vyhodnocena pomocí programu Flowlogic. Signifikance $p < 0,5$ znázorněna * (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

Western blot analýza neodhalila modulaci exprese Alixu ani Calnexinu vlivem ellipticinu, která byla patrná u buněk ošetřených induktorem stresu ER tunicamycinem. Hladin polyubikvitinovaných proteinů se po expozici ellipticinu neměnila a zvýšení bylo opět patrné pouze u buněk ošetřených tunicamycinem a inhibitorem proteazomu MG-132 (**Obr. 5.22**). Zvýšenou hladinu fosforylovaného PERK (p-PERK) jsme rovněž pozorovali pouze u buněk ošetřených tunicamycinem (**Obr. 5.23**).

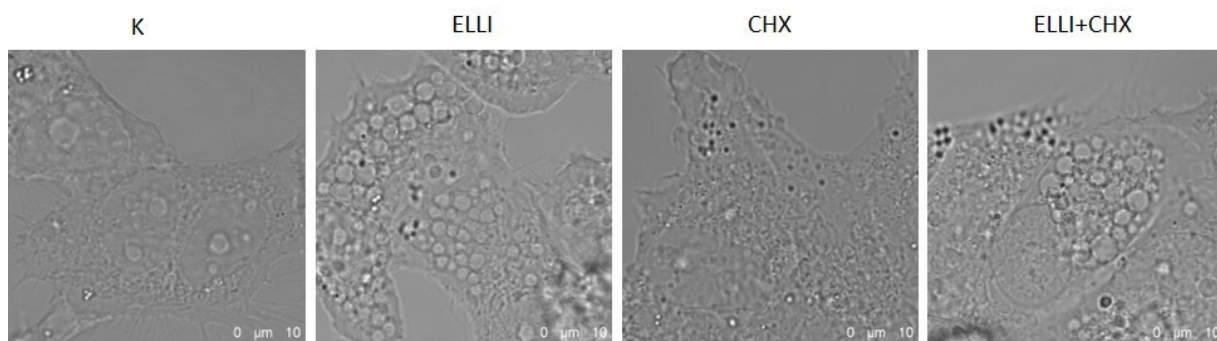


Obr. 5.22: Výsledky ověření dráhy UPR metodou Western blot. Expres proteinů Ubi-1, Calnexin a Alix v buňkách UKF-NB-4 neošetřených (K), ošetřených 5 μM ellipticinem (ELLI), tunicamycinem o koncentraci 200 ng/ml (TUNICA) a 50 nM MG-132 po dobu 24 hodin. Jako kontrola rovnoměrného množství proteinu ve všech vzorcích byl použit aktin. Reprezentativní snímek membrán jednoho ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 5.23: Výsledky ověření fosforylace proteinu PERK metodou Western blot. Expres proteinů PERK a fosforylovaného p-PERK v buňkách UKF-NB-4 neošetřené (K), ošetřené 5 μM ellipticinem (ELLI) a tunicamycinem o koncentraci 200 ng/ml (TUNICA) po dobu 24 hodin. Jako kontrola rovnoměrného množství proteinu ve všech vzorcích byl použit aktin. Reprezentativní snímek membrán jednoho ze tří nezávislých experimentů.

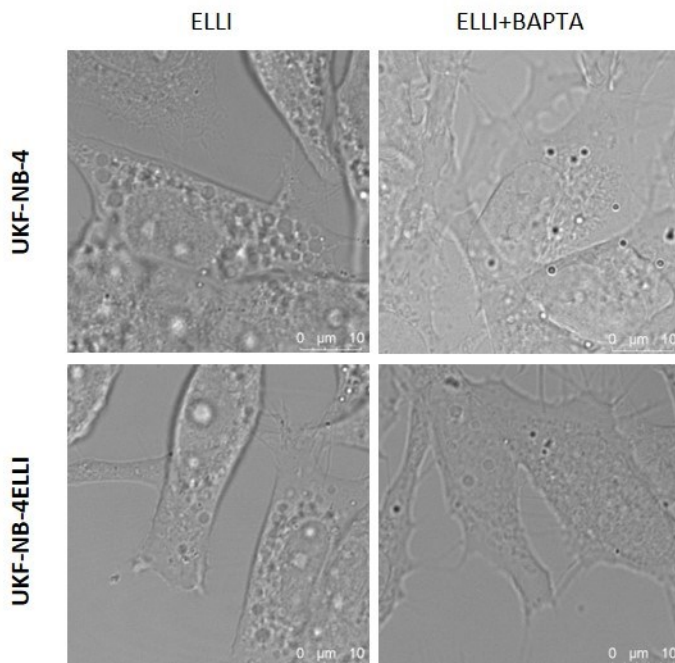
Inhibice syntézy proteinů cykloheximidem navíc nezabránila ellipticinem indukované cytoplazmatické vakuolizaci (**Obr. 5.24**), což naznačuje, že UPR se pravděpodobně na tomto procesu nepodílí.



Obr. 5.24: Snímky z konfokálního mikroskopu. Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů ukazují buňky UKF-NB-4 neošetřené (K), ošetřené 5 μM ellipticinem (ELLI), 60 μM cyklohemididem (CHX) nebo jejich kombinací (ELLI+CHX) po dobu 4 hodin.

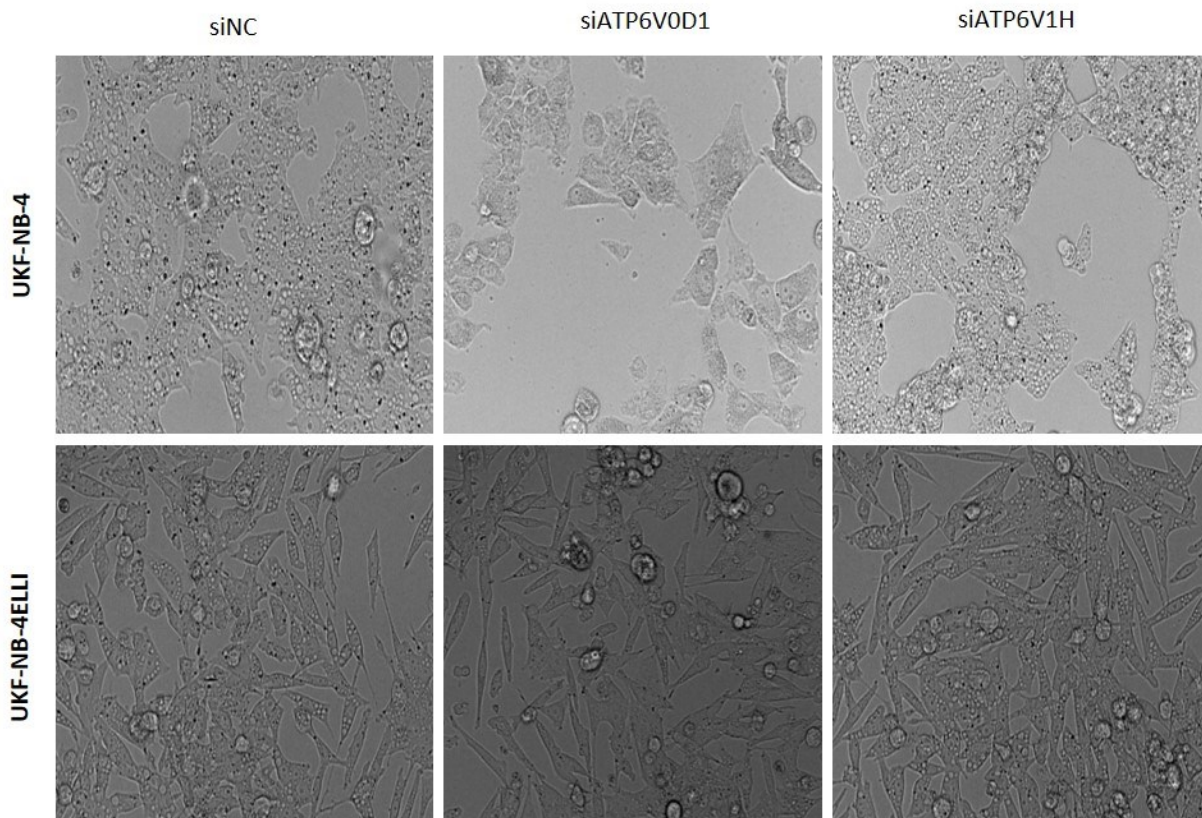
5.10 Vápník a ellipticinem indukovaná vakuolizace

Dalším možným mechanismem, podílejícím se na otoku endoplasmatického retikula může být dysregulace vápníku (Ca^{2+}). Před ošetřením buněk ellipticinem jsme je tedy vystavili působení chelátoru vápníku BAPTA-AM. Z obrázků z konfokálního mikroskopu je patrné, že předběžné ošetření buněk BAPTA-AT vedlo ke snížení ellipticinem indukované vakuolizace (**Obr. 5.25**).



Obr. 5.25: Snímky z konfokálního mikroskopu. Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů ukazují linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} ošetřené 5μM ellipticinem (ELLI) po dobu 4 hodin, nebo předběžně ošetřené 10μM BAPTA-AM po dobu 30 min a následně 5μM ellipticinem po dobu 4 hodin (ELLI+BAPTA).

Abychom dále ověřili roli vápníku v tomto procesu, zavedli jsme látku MPP⁺ (1-methyl-4-fenylpyridin), která mimo jiné způsobuje dysregulaci Ca²⁺. Výsledky ukázaly, že MPP⁺ indukuje tvorbu vakuol, podobně jako ellipticin. Snížení exprese podjednotky ATP6V0D1 V-ATPázy vedl k potlačení nebo úplnému zrušení MPP⁺ indukované tvorby těchto vakuol, zatímco umlčení podjednotky ATP6V1H nemělo žádný vliv (**Obr. 5.26**). Tato zjištění podporují hypotézu, že Ca²⁺ a podjednotka ATP6V0D1 hrají roli ve vakuolizačním procesu indukovaném ellipticinem.



Obr. 5.26: Snímky z konfokálního mikroskopu. Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů ukazují buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} transfekované 10 nM siNC nekodující, siATP6V0D1 a siTP6V1H po dobu 48 hodin a následně inkubované 24 hodin s 1 mM MPP⁺.

6 Diskuze

NBL, závažné nádorové onemocnění dětského věku s nepříznivými výsledky léčby, zdůrazňuje naléhavou potřebu vývoje nových a účinnějších léčebných postupů. Přes pokrok v onkologii zůstává léková rezistence závažným problémem, který komplikuje úspěšnou léčbu těchto onemocnění. Jedním z mechanismů, které k této rezistenci přispívají, je lyzozomální sekvestrace. V tomto procesu se některá léčiva, zejména slabé báze s hydrofobními vlastnostmi, hromadí v lyzozomech, což jsou buněčné organely s kyselým prostředím. Nízké pH v lyzozomech je udržováno protonovou pumpou V-ATPázou. Tato sekvestrace brání léčivům v dosažení jejich cílů v buňce, čímž snižuje jejich účinnost (Zhitomirsky a Assaraf 2017; 2016; Hraběta et al. 2020). Zvýšená exprese některých podjednotek V-ATPázy byla pozorována u různých nádorových onemocnění, včetně karcinomu prsu, plic a slinivky břišní. (Hendrix et al. 2013; Lu et al. 2013; Liu et al. 2015; Collins a Forgac 2018; Chung et al. 2011). Dále bylo prokázáno, že složení podjednotek V-ATPázy koreluje s agresivitou glioblastomových buněk odvozených od pacientů. Glioblastomy a recidivující gliomy vykazují charakteristický expresní vzor podjednotek V-ATPázy (Terrasi et al. 2019). Naše výsledky ukazují, že podjednotka ATP6V0D1 V-ATPázy je zvýšeně exprimována v buněčné linii NBL rezistentní na ellipticin a cisplatinu, které také vykazují změny v expresi dalších podjednotek V-ATPázy. Kromě své funkce protonové pumpy hraje V-ATPáza důležitou roli v regulaci klíčových signálních drah spojených s rozvojem nádorového onemocnění. Ovlivňuje například transport a recyklaci receptorových tyrosinkináz, jako jsou EGFR a HER2, které se podílejí na buněčné proliferaci, přežití a migraci (Takeuchi a Ito 2011; Alwan et al. 2003). Její aktivita také moduluje signalizaci mTOR prostřednictvím regulace intracelulárních hladin aminokyselin a lyzozomální funkce, což jsou procesy zásadní pro buněčný růst a metabolismus (Xu et al. 2012). Dále V-ATPáza reguluje acidifikaci endozomů, což je nezbytné pro aktivaci signální dráhy Wnt, která je často narušena u nádorových onemocnění. Kromě toho je V-ATPáza klíčová pro autofagii, proces degradace poškozených buněčných komponent, který může v závislosti na kontextu podporovat nebo potlačovat růst nádoru. Tato protonová pumpa také ovlivňuje další signální dráhy zapojené do proliferace, přežití a migrace nádorových buněk, jako jsou dráhy MAPK a PI3K/Akt (Stransky et al. 2016). Bylo prokázáno, že inhibice V-ATPázy významně snižuje růst, migraci a invazi nádorových buněk (Santos-Pereira et al. 2021). Kombinace chemoterapeutik s inhibitory V-ATPázy má synergický protinádorový účinek u nádorových buněk rezistentních

na léčbu, které často vykazují zvýšenou aktivitu V-ATPázy. U karcinomu ovaria rezistentního na cisplatinu je pozorována nadměrná exprese podjednotky $\alpha 2$ V-ATPázy. Její inhibice spouští apoptózu narušením opravy DNA a obnovuje citlivost na cisplatinu. Podobně, vysoká exprese podjednotky V-ATPázy C1 je spojena s MDR u orálního spinocelulárního karcinomu. (Kulshrestha et al. 2016; Pérez-Sayáns et al. 2010). Naše studie potvrzuje tato zjištění a prokazuje zvýšenou citlivost na ellipticin i cisplatinu po inhibici bafilomycinem nebo knockdownu d podjednotky V-ATPázy (ATP6V0D1) v buňkách neuroblastomu, které jsou vůči těmto cytostatikům rezistentní. Navíc inhibice podjednotky d vedla ke snížení proliferace a migrace a indukovala zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M. He, J. et al. prokázali, že podjednotka d V-ATPázy hraje klíčovou roli ve vývoji MDR. Například pozitivně reguluje protein asociovaný s Yes, který přispívá k rezistenci na paclitaxel u epitelálního karcinomu vaječníků. Inhibitor protonové pumpy, esomeprazol, významně zvyšuje citlivost na léky v těchto buňkách (He et al. 2019). V souladu s předchozími studiemi, které prokázaly zvýšenou expresi ATP6V0D1 u pacientek s pokročilým stádiem karcinomu vaječníků (III-IV) ve srovnání s pacientkami v časném stádiu (I-II) (He et al. 2019). Naše výsledky také naznačují asociaci mezi zvýšenou expresí ATP6V0D1 a progresí nádorového onemocnění v průběhu léčby cisplatinou nebo relapsem po jejím skončení. To naznačuje možnou souvislost s rozvojem rezistence na chemoterapii. Tato shoda mezi nálezy u různých typů nádorů podporuje hypotézu, že zvýšená exprese ATP6V0D1 by mohla představovat obecný mechanismus spojený s progresí nádorového onemocnění a rozvojem rezistence na léčbu cisplatinou. Na základě našich nálezů u buněk rezistentních vůči ellipticinu je možné, že tato podjednotka může mít vztah i k rezistenci vůči jiným v praxi užívaným cytostatikům. Dále jsme pozorovali zvýšenou lyzozomální kapacitu, měřeno intenzitou fluorescence LTR, v buněčných liniích rezistentních vůči ellipticinu a cisplatině. Tato pozorování naznačují, že lyzozomální sekvestrace by mohla hrát roli v rezistenci vůči těmto lékům, což dále rozšiřuje naše chápání mechanismů rezistence na chemoterapii a nabízí potenciální nové terapeutické cíle. Inhibice V-ATPázy, buď bafilomycinem A nebo knockdownem podjednotky d, vedla k redukci intenzity fluorescence LTR, což podporuje tuto hypotézu. Naše zjištění týkající se cisplatinu jsou součástí širší studie, která porovnávala proteomické podpisy senzitivních a rezistentních NBL buněk, kde jsme zjistili, že rezistentní buněčná linie vykazovala zvýšenou expresi nejen ATP6V0D1, ale i transportérů ABC a proteinů SLC, které jsou známy svou rolí v transportu a sekvestraci léků a zároveň se podílí na vylučování léků z buňky. Navíc, tyto rezistentní buňky také vykazovaly

zvýšenou aktivitu proteazomu, což by mohlo přispívat k degradaci proteinů regulujících buněčný cyklus a apoptózu, a tím podporovat přežití buněk (Merlos Rodrigo et al. 2019).

V souladu s předchozími pozorováními Stiborové et al., jsme potvrdili, že ellipticin indukuje vakuolizaci. (Hrabeta et al. 2015), avšak původ těchto vakuol nebyl v uvedené studii objasněn. Pozorovali jsme, že inhibice V-ATPázy vedla ke snížení ellipticinem indukovaných vakuol a naše data naznačují, že tyto nově vytvořené vakuoly jsou deriváty endoplazmatického retikula (ER), jehož dilatace je známou morfologickou odpovědí na buněčný stress. V rámci adaptace na tento stres buňky aktivují signální dráhu UPR. UPR je iniciována aktivací tří transmembránových proteinů ER: Inositol Requiring Enzyme 1 (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK) a Activating Transcription Factor 6 (ATF6) (Oslowski a Urano 2011). Nicméně, zapojení UPR do ellipticinem zprostředkované vakuolizace jsme nepotvrdili. Hägg et al. popsali podobné výsledky, kdy pouze některá analoga ellipticinu, indukovala zvýšenou expresi chaperonu GRP78/BiP v reakci na ER stres v buňkách karcinomu prsu MDA-MB-231 (Hägg et al. 2004). Dilatace ER může být způsobena dysregulací buněčného kalcia. Vzhledem k tomu, že lyzozomy jsou známy jako malé zásobárny Ca^{2+} , je možné, že existuje spojení mezi lyzozomální manipulací s kalcie a dilatací ER (Yang et al. 2019; Oslowski a Urano 2011). Expozice buněk NBL BAPTA, chelátorem vápníku, inhibovala ellipticinem indukovanou vakuolizaci, což potvrzuje úlohu vápníku v tomto procesu. Přesný mechanismus, kterým vápník přispívá k tvorbě vakuol indukovaných ellipticinem, zůstává neobjasněn, nicméně může zahrnovat TRPML1, lyzozomální Ca^{2+} kanál, který hraje klíčovou roli v uvolňování Ca^{2+} z lyzozomů. Uvolňování Ca^{2+} zprostředkované TRPML1 spouští řadu Ca^{2+} -dependentních procesů, včetně biogeneze lyzozomů a autofagie. Aktivace TRPML1 je přitom závislá na lyzozomální acidifikaci, která je udržována V-ATPázou. Inhibice V-ATPázy bafilomycinem A narušuje acidifikaci lyzozomů, což vede k zablokování aktivace TRPML1. Tento poznatek dále podporuje hypotézu o úloze TRPML1 v procesu tvorby vakuol závislém na vápníku. (Yang et al. 2019; Goodwin et al. 2021).

Můžeme tedy shrnout, že podjednotka ATP6V0D1 není pouze strukturální a funkční součástí V-ATPázy, ale že může mít i další specifické funkce ve specifickém kontextu a že hraje u neuroblastu specifickou roli.

7 Závěr

Cílem předkládané dizertační práce je prohloubit znalosti o roli V-ATPázy v chemorezistenci buněk neuroblastomu (NBL), charakterizovat expresi podjednotek V-ATPázy v buňkách NBL, prozkoumat jejich potenciální dysregulaci a objasnit jejich příspěvek k chemorezistenci vůči elipticinu a cisplatině a případnou roli v dalších biologických procesech. Nejdůležitější získané poznatky lze shrnout následovně:

Srovnávací analýza exprese všech podjednotek V-ATPázy mezi chemosenzitivní UKF-NB-4 a od této linie odvozenými neuroblastomovými liniemi rezistentními vůči elipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) a cisplatině (UKF-NB-4^{CDDP}) odhalila zvýšenou expresi ATP6V0D1 na úrovni mRNA i proteinu v rezistentních buněčných liniích, což naznačuje její potenciální roli v mechanismech rezistence.

V souladu s hypotézou o úloze V-ATPázy v procesu lyzozomální sekvestrace jsme provedli experimentální sledování příjmu lyzozomálního barviva do buněk, přičemž jsme se zaměřili na porovnání rozdílů mezi senzitivní a rezistentními buněčnými liniemi. Výsledky naší studie prokázaly zvýšenou absorpci lyzozomálního barviva v rezistentních neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP} v porovnání s chemosenzitivní linií. Následně, po úspěšné aplikaci jak celkového inhibitoru V-ATPázy, tak specifické inhibice ATP6V0D1 (siATP6V0D1), jsme zaznamenali signifikantní snížení vstupu lyzozomálního barviva. Tato experimentální zjištění poskytují důležitou podporu pro naši výchozí hypotézu, která předpokládá významnou roli V-ATPázy, potažmo ATP6V0D1 podjednotky, v mechanismu lyzozomální sekvestrace.

Aplikace celkového inhibitoru V-ATPázy, stejně jako cílená inhibice podjednotky ATP6V0D1, vedla k významnému zesílení cytotoxického účinku obou použitých cytostatik. Kromě toho jsme pozorovali, že knockdown ATP6V0D1 ovlivnil i další zásadní biologické procesy v nádorových buňkách. Konkrétně došlo k potlačení buněčné proliferace a migrace, a zároveň byla indukována zástava buněčného cyklu ve fázi G2/M.

Dalším cílem bylo ověřit potenciální souvislost mezi expresí V-ATPázy a rozvojem rezistence na cisplatinu u pacientů s neuroblastomem. Provedli jsme analýzu exprese podjednotky ATP6V0D1 ve vzorcích nádorů neuroblastomu získaných od 10 pacientů, kteří podstoupili opakované chirurgické zákroky. Jeden vzorek byl však nehodnotitelný. Data získaná

od devíti pacientů naznačují, že zvýšená exprese ATP6V0D1 souvisí s rozvojem rezistence vůči cisplatině, což je lék standardně používaný v léčbě vysokorizikového neuroblastomu (HR-NBL). U většiny pacientů léčených vysokými dávkami cisplatinou byla pozorována zvýšená exprese ATP6V0D1 ve vzorcích získaných z recidiv. Výjimku tvořili pacienti s malým počtem nádorových buněk nebo ti, kteří nebyli léčeni cisplatinou. Tato zjištění podporují význam exprese ATP6V0D1 ve vývoji rezistence na chemoterapii a mohou mít důležité důsledky pro léčbu neuroblastomu.

Díky fluorescenčním vlastnostem ellipticinu lze pozorovat jeho buněčnou lokalizaci, a tedy i případnou sekvestraci. Snímky z konfokálního mikroskopu skutečně potvrzují přítomnost ellipticinu v lyzozomech a zároveň ukazují na tvorbu ellipticinem indukovaných vakuol, které byly identifikovány jako dilatované části endoplazmatického retikula (ER), a jejichž tvorba byla potlačena inhibicí ATP6V0D1 podjednotky V-ATPázy. Nepotvrdili jsme přímé zapojení UPR do ellipticinem zprostředkované vakuolizace/dilatace ER a tedy paraptózy. Naše experimenty s chelátorem vápníku BAPTA ukázaly zásadní roli vápníku v tomto procesu, avšak přesný mechanismus, kterým vápník přispívá k tvorbě vakuol indukovaných ellipticinem, zůstává neobjasněn.

Kromě inhibice podjednotky ATP6V0D1 byla provedena i inhibice další podjednotky V-ATPázy, ATP6V1H. Je pozoruhodné, že inhibice ATP6V1H nevedla k žádnému pozorovatelnému efektu na buňky neuroblastomu, což dále podtrhuje specifickou a zásadní úlohu podjednotky ATP6V0D1 u tohoto typu nádoru.

Tato zjištění potvrzují významnou roli dysregulace V-ATPázy, zejména komplexní roli podjednotky ATP6V0D1, nejen v mechanismech rezistence vůči chemoterapii, ale i v regulaci klíčových buněčných procesů spojených s maligním růstem. V-ATPáza tedy představuje potenciální terapeutický cíl pro překonání tohoto problému. Inhibice V-ATPázy nebo specificky ATP6V0D1 se jeví jako slibná strategie pro překonání rezistence a zvýšení účinnosti stávajících chemoterapeutik. Navíc inhibice ATP6V0D1 vykazuje i přímý inhibiční vliv na buňky NBL, což by mohlo vést ke zlepšení prognózy pacientů s tímto nádorem. Nicméně, další výzkum v této oblasti je nezbytný pro plné pochopení role V-ATPázy v patogenezi neuroblastomu a pro vývoj nových, cílených terapeutických strategií.

8 Souhrn

Neuroblastom (NBL), nejčastější solidní extrakraniální nádor v dětské populaci, představuje závažný klinický problém. Toto onemocnění se často vyznačuje nepříznivou prognózou. Jednou z hlavních překážek úspěšné léčby NBL je rozvoj rezistence na léčbu. Lyzozomální sekvestrace léčiv, usnadněná protonovou pumpou V-ATPázou, se jeví jako jeden z klíčových mechanismů této rezistence. Předkládaná dizertační práce se proto zaměřuje na podrobnější zkoumání role V-ATPázy, protonové pumpy zodpovědné za acidifikaci lyzozomů, v kontextu mechanismů lékové rezistence u neuroblastomu. Prokázali jsme zvýšenou expresi podjednotky ATP6V0D1 V-ATPázy v NBL buňkách rezistentních vůči ellipticinu a cisplatině, což bylo doprovázeno zvýšenou lyzozomální kapacitou. Inhibice V-ATPázy nebo snížení exprese ATP6V0D1 vedlo ke zvýšení citlivosti buněk k těmto cytostatikům, potlačení proliferace a migrace buněk a zastavení buněčného cyklu. Kromě toho bylo zjištěno, že ellipticin indukuje tvorbu vakuol z endoplazmatického retikula. Tento proces, který nemá známky paraptózy, se zdá být závislý na vápníku a ovlivněný inhibicí ATP6V0D1, nicméně přesný mechanismus zůstává neobjasněn. Inhibice jiné podjednotky V-ATPázy, ATP6V1H, neměla žádný vliv na buňky NBL, což dále zdůrazňuje specifickou roli ATP6V0D1. Studie také prokázala souvislost mezi zvýšenou expresí ATP6V0D1 a rozvojem rezistence vůči cisplatině u pacientů s neuroblastomem. Zvýšená exprese ATP6V0D1 byla pozorována u většiny pacientů léčených vysokými dávkami cisplatin, což podporuje význam této podjednotky ve vývoji chemorezistence.

Tato zjištění potvrzují významnou roli dysregulace V-ATPázy, zejména podjednotky ATP6V0D1, v chemorezistenci neuroblastomu. Inhibice V-ATPázy se jeví jako slibná strategie pro překonání rezistence a zvýšení účinnosti stávajících chemoterapeutik, což by mohlo vést ke zlepšení prognózy pacientů s NBL.

9 Summary

Neuroblastoma (NBL), the most common solid extracranial tumor in childhood, represents a serious problem. This cancer have often unfavorable prognosis. One of the main obstacles to successful NBL treatment is the development of drug resistance. Lysosomal sequestration, facilitated by the proton pump V-ATPase, is emerging as one of the key mechanisms of this resistance. Therefore, we focused on a detailed examination of the role of V-ATPase, the proton pump responsible for lysosome acidification, in the context of drug resistance mechanisms in neuroblastoma. Our results demonstrated increased expression of the ATP6V0D1 subunit of V-ATPase in NBL cells resistant to ellipticine and cisplatin, which was accompanied by increased lysosomal capacity. Inhibition of V-ATPase or decreased expression of ATP6V0D1 led to increased sensitivity of cells to these cytostatics, suppression of cell proliferation and migration, and cell cycle arrest. Furthermore, it was found that ellipticine induces the formation of vacuoles from the endoplasmic reticulum. This process, which does not appear to be paraptosis, appears to be calcium-dependent and affected by ATP6V0D1 inhibition, however the exact mechanism remains unclear. Inhibition of another V-ATPase subunit, ATP6V1H, had no effect on NBL cells, further highlighting the specific role of ATP6V0D1. The study also demonstrated an association between increased ATP6V0D1 expression and the development of cisplatin resistance in patients with neuroblastoma. Increased ATP6V0D1 expression was observed in the majority of patients treated with high doses of cisplatin, supporting the importance of this subunit in the development of chemoresistance.

These findings confirm the significant role of V-ATPase dysregulation, particularly of the ATP6V0D1 subunit, in neuroblastoma chemoresistance. Inhibition of V-ATPase appears to be a promising strategy to overcome resistance and increase the effectiveness of existing chemotherapeutics, which could lead to improved prognosis for patients with NBL.

10 Seznam publikací autora

Belhajová M, Vicha A, Burgert L, Brožková I, Michalíčková L, Hrdina R, Moravec T, Netuka D, Musil Z, Hrdina R. En route to local glioblastoma treatment with temozolomide doped hyaluronan fibres: formulation and *in vitro* cell studies. RSC Med Chem. 2023 Aug 3;14(9):1662-1666. doi: 10.1039/d3md00261f. PMID: 37731694; PMCID: PMC10507811. IF=4,1, Q2

Krsková L, Šípalová B, Němečková T, Strnadová M, Kalendová T, Kalfusová A, Alexandra, Malkusová, Šandová M, Koblížek M, Balko J, Vicha A, Brož P, Jenčová P, Štolová L, Dagmar, Voříšková, **Belhajová M**, Zápotocký M, Sumerauer D, Zámečník J. A rational approach to the CNS tumors diagnostics. Cesk Patol. 2022 Fall;58(3):135-137. PMID: 36224035.

Belhajova M, Podhorska N, Vicha A, Eckschlager T. KDM5B expression in cisplatin resistant neuroblastoma cell lines. Oncol Lett. 2022 Aug 31;24(4):365. doi: 10.3892/ol.2022.13485. PMID: 36238850; PMCID: PMC9494299. IF=2,5, Q3

Fabian O, Klocperk A, Lerchova T, Jencova P, Stolova L, **Belhajova M**, Voriskova D, Kazeka D, Vicha A, Hradsky O, Bronsky J. Serum and Mucosal CD30 in Pediatric Inflammatory Bowel Diseases: Useful Biomarker for Diagnosis and Disease Activity Monitoring? Dig Dis Sci. 2022 Sep 3. doi: 10.1007/s10620-022-07677-4. Epub ahead of print. PMID: 36056999. IF=2,53, Q3

Hraběta J, **Belhajová M**, Šubrtová H, Merlos Rodrigo MA, 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. 2020 Jun 20;21(12):4392. doi: 10.3390/ijms21124392. PMID: 32575682; PMCID: PMC7352242. IF=4,9, Q1

Merlos Rodrigo MA, Buchtelova H, de Los Rios V, Casal JI, Eckschlager T, Hrabeta J, **Belhajova M**, Heger Z, Adam V. Proteomic Signature of Neuroblastoma Cells UKF-NB-4 Reveals Key Role of Lysosomal Sequestration and the Proteasome Complex in Acquiring Chemoresistance to Cisplatin. J Proteome Res. 2019 Mar 1;18(3):1255-1263. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00867. Epub 2019 Jan 11. Erratum in: J Proteome Res. 2022 Jan 7;21(1):295-296. PMID: 30592607. IF=3,8, Q1

Cipro Š, **Belhajová M**, Eckschlager T, Zámečník J. MicroRNA expression in pediatric intracranial ependymomas and their potential value for tumor grading. *Oncol Lett.* 2019 Jan;17(1):1379- 1383. doi: 10.3892/ol.2018.9685. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30655909; PMCID: PMC6313077. IF=2,5 Q3

11 Seznam použité literatury

Adam, Zdeněk, Marta, Krejčí, Vorlíček, Jiří a Kol., 2010. *Speciální onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-648-9.

Alberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith a Walter, Peter, 2002. The Molecular Basis of Cancer-Cell Behavior. In: *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, s. 1400. ISBN 978-0-8153-3218-3. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26902/>

Alwan, Husam A.J., Van Zoelen, Everardus J.J. a Van Leeuwen, Jeroen E.M., 2003. Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(37), 35781–35790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301326200>

Appelqvist, Hanna, Wäster, Petra, Kågedal, Katarina a Öllinger, Karin, 2013. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *Journal of molecular cell biology*. **5**(4), 214–226. <https://doi.org/10.1093/JMCB/MJT022>

Attiyeh, Edward F., London, Wendy B., Mossé, Yael P., Wang, Qun, Winter, Cynthia, Khazi, Deepa, McGrady, Patrick W., Seeger, Robert C., Look, A. Thomas, Shimada, Hiroyuki, Brodeur, Garrett M., Cohn, Susan L., Matthay, Katherine K. a Maris, John M., 2005. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. **353**(21), 2243–2253. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA052399>

Baba, Alecsandru I. a Câtoi, Cornel, 2007. CARCINOGENESIS. In: *Comparative Oncology*. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, s. 787. ISBN 978-073-27-1457-7. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9552/>

Bachetti, Tiziana, Di Paolo, Daniela, Di Lascio, Simona, Mirisola, Valentina, Brignole, Chiara, Bellotti, Marta, Caffa, Irene, Ferraris, Chiara, Fiore, Michele, Fornasari, Diego, Chiarle, Roberto, Borghini, Silvia, Pfeffer, Ulrich, Ponzoni, Mirco, Ceccherini, Isabella a Perri, Patrizia, 2010. PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: In vitro identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma. *PLoS ONE*. **5**(10), e13108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013108>

Ballabio, Andrea a Bonifacino, Juan S., 2020. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **21**(2), 101–118. <https://doi.org/10.1038/S41580-019-0185-4>

Banerjee, Sanghamitra, Pabbathi, Ashok, Sekhar, M. Chandra a Samanta, Anunay, 2011. Dual fluorescence of ellipticine: excited state proton transfer from solvent versus solvent mediated intramolecular proton transfer. *The journal of physical chemistry. A*. **115**(33), 9217–9225. <https://doi.org/10.1021/JP206232B>

Belhajova, Marie, Podhorska, Natalia, Vicha, Ales a Eckschlager, Tomas, 2022. KDM5B expression in cisplatin resistant neuroblastoma cell lines. *Oncology letters*. **24**(4). <https://doi.org/10.3892/OL.2022.13485>

Bell, Michelle C., Meier, Shelby E., Ingram, Alexandria L. a Abisambra, Jose F., 2016. PERK-opathies: An Endoplasmic Reticulum Stress Mechanism Underlying Neurodegeneration. *Current Alzheimer Research*. **13**(2), 150–163. <https://doi.org/10.2174/1567205013666151218145431>

Brodeur, Garrett M., 2018. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell and Tissue Research*. **372**(2), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2761-2>

Capasso, Mario, Devoto, Marcella, Hou, Cuiping, Asgharzadeh, Shahab, Glessner, Joseph T., Attiyeh, Edward F., Mosse, Yael P., Kim, Cecilia, Diskin, Sharon J., Cole, Kristina A., Bosse, Kristopher, Diamond, Maura, Laudenslager, Marci, Winter, Cynthia, Bradfield, Jonathan P., Scott, Richard H., Jagannathan, Jayanti, Garriss, Maria, McConville, Carmel, London, Wendy B., Seeger, Robert C., Grant, Struan F.A., Li, Hongzhe, Rahman, Nazneen, Rappaport, Eric, Hakonarson, Hakon a Maris, John M., 2009. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nature genetics*. **41**(6), 718–723. <https://doi.org/10.1038/NG.374>

Chatterjee, Nimrat a Walker, Graham C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*. **58**(5), 235. <https://doi.org/10.1002/EM.22087>

Cheung, Nai-Kong V. a Dyer, Michael A., 2013. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. **13**(6), 397–411.

<https://doi.org/10.1038/nrc3526>

Chung, Chuhan, Mader, Christopher C., Schmitz, John C., Atladottir, Jorunn, Fitchev, Phillip, Cornwell, Mona L., Koleske, Anthony J., Crawford, Susan E. a Gorelick, Fred, 2011. The vacuolar-ATPase modulates matrix metalloproteinase isoforms in human pancreatic cancer. *Laboratory Investigation*. **91**(5), 732–743. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.8>

Cohn, Susan L., Pearson, Andrew D.J., London, Wendy B., Monclair, Tom, Ambros, Peter F., Brodeur, Garrett M., Faldum, Andreas, Hero, Barbara, Iehara, Tomoko, Machin, David, Mosseri, Veronique, Simon, Thorsten, Garaventa, Alberto, Castel, Victoria a Matthay, Katherine K., 2009. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: An INRG task force report. *Journal of Clinical Oncology*. **27**(2), 289–297. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6785>

Collins, Michael P. a Forgac, Michael, 2018. Regulation of V-ATPase Assembly in Nutrient Sensing and Function of V-ATPases in Breast Cancer Metastasis. *Frontiers in Physiology*. **9**(JUL), 902. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00902>

Collins, Michael P. a Forgac, Michael, 2020. *Regulation and function of V-ATPases in physiology and disease*. 12. prosinec 2020. B.m.: NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183341>

Cotter, Kristina, Capecci, Joseph, Sennoune, Souad, Huss, Markus, Maier, Martin, Martinez-Zaguilan, Raul a Forgac, Michael, 2015. Activity of Plasma Membrane V-ATPases Is Critical for the Invasion of MDA-MB231 Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. **290**(6), 3680–3692. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.611210>

Dan, Vipin Mohan, Varghese, Thania Sara, Viswanathan, Gayathri a Baby, Sabulal, 2019. Ellipticine, its Derivatives: Re-evaluation of Clinical Suitability with the Aid of Drug Delivery Systems. *Current Cancer Drug Targets*. **20**(1), 33–46. <https://doi.org/10.2174/1568009619666190927150131>

Daniel, Chloë, Bell, Charlotte, Burton, Christopher, Harguindey, Salvador, Reshkin, Stephan J. a Rauch, Cyril, 2013. The role of proton dynamics in the development and maintenance of multidrug resistance in cancer. *Biochimica et biophysica acta*. **1832**(5), 606–617. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2013.01.020>

Dawson, Mark A. a Kouzarides, Tony, 2012. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell*. **150**(1), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>

Di Paolo, Daniela, Pastorino, Fabio, Brignole, Chiara, Corrias, Maria Valeria, Emionite, Laura, Cilli, Michele, Tamma, Roberto, Priddy, Leslie, Amaro, Adriana, Ferrari, Davide, Marotta, Roberto, Ferretti, Elisa, Pfeffer, Ulrich, Ribatti, Domenico, Sementa, Angela Rita, Brown, David, Ikegaki, Naohiko, Shimada, Hiroyuki, Ponzoni, Mirco a Perri, Patrizia, 2020. Combined Replenishment of miR-34a and let-7b by Targeted Nanoparticles Inhibits Tumor Growth in Neuroblastoma Preclinical Models. *Small*. **16**(20). <https://doi.org/10.1002/SMLL.201906426>

Diakov, Theodore T. a Kane, Patricia M., 2010. Regulation of vacuolar proton-translocating ATPase activity and assembly by extracellular pH. *The Journal of biological chemistry*. **285**(31), 23771–23778. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.110122>

DuBois, Steven G., Macy, Margaret E. a Henderson, Tara O., 2022. High-Risk and Relapsed Neuroblastoma: Toward More Cures and Better Outcomes. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*. **42**(42), 768–780. https://doi.org/10.1200/EDBK_349783

Eaton, Amity F., Merkulova, Maria a Brown, Dennis, 2021. The H⁺-ATPase (V-ATPase): from proton pump to signaling complex in health and disease. *American journal of physiology. Cell physiology*. **320**(3), 392–414. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00442.2020>

Elmore, Susan, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. **35**(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Fais, Stefano, 2010. Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism. *Journal of internal medicine*. **267**(5), 515–525. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2796.2010.02225.X>

Feng, Yuchen, He, Ding, Yao, Zhiyuan a Klionsky, Daniel J., 2013. The machinery of macroautophagy. *Cell Research*. **24**(1), 24–41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>

Ferlay, Jacques, Colombet, Murielle, Soerjomataram, Isebel, Mathers, Colin, Parkin, Max D., Piñeros, Marion, Znaor, Ariana a Bray, Freddie, 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*. **144**(8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/IJC.31937>

Fong, Chin-to, Dracopoli, Nicholas C., White, Petr S., Merrill, Pauline T., Griffith, Rogers C., Housman, David E. a Brodeur, Garrett M., 1989. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **86**(10), 3753–3757. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3753>

Forgac, Michael, 2007. Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **8**(11), 917–929. <https://doi.org/10.1038/nrm2272>

Gammoh, Noor, Fraser, Jane, Puente, Cindy, Syred, Heather M., Kang, Helen, Ozawa, Tatsuya, Lam, Du, Acosta, Juan Carlos, Finch, Andrew J., Holland, Eric a Jiang, Xuejun, 2016. Suppression of autophagy impedes glioblastoma development and induces senescence. *Autophagy*. **12**(9), 1431–1439. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1190053>

Gong, Yitao, Fan, Zhiyao, Luo, Guopei, Yang, Chao, Huang, Qiuyi, Fan, Kun, Cheng, He, Jin, Kaizhou, Ni, Quanxing, Yu, Xianjun a Liu, Chen, 2019. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*. **18**(100), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>

Goodwin, Jonathan M., Walkup, Ward G., Hooper, Kirsty, Li, Taoyingnan, Kishi-Itakura, Chieko, Ng, Aylwin, Lehmberg, Timothy, Jha, Archana, Kommineni, Sravya, Fletcher, Katherine, Garcia-Fortanet, Jorge, Fan, Yaya, Tang, Qing, Wei, Menghao, Agrawal, Asmita, Budhe, Sagar R., Rouduri, Sreekanth R., Baird, Dan, Saunders, Jeff, Kiselar, Janna, Chance, Mark R., Ballabio, Andrea, Appleton, Brent A., Brumell, John H., Florey, Oliver a Murphy, Leon O., 2021. GABARAP sequesters the FLCN-FNIP tumor suppressor complex to couple autophagy with lysosomal biogenesis. *Science Advances*. **7**(40), 1–19. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj2485>

Greer, Eric L. a Shi, Yang, 2012. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*. **13**(5), 343–357. <https://doi.org/10.1038/nrg3173>

Grimm, Christian, Bartel, Karin, Vollmar, Angelika M. a Biel, Martin, 2018. Endolysosomal cation channels and cancer—a link with great potential. *Pharmaceuticals*. **11**(1), 1–8. <https://doi.org/10.3390/ph11010004>

- Hägg, Maria, Berndtsson, Maria, Mandic, Aleksandra, Zhou, Rong, Shoshan, Maria C. a Linder, Stig, 2004. Induction of endoplasmic reticulum stress by ellipticine plant alkaloids. *Molecular Cancer Therapeutics*. **3**(4), 489–497. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.489.3.4>
- Hanahan, Douglas a Weinberg, Robert A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hanson, Sweata, Dharan, Aiswarya, P. V., Jinsha, Pal, Sanjay, Nair, Bipin G., Kar, Rekha a Mishra, Nandita, 2023. Paraptosis: a unique cell death mode for targeting cancer. *Frontiers in Pharmacology*. **14**(June), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1159409>
- Harding, Margaret a Grummitt, Annaleise, 2005. 9-Hydroxyellipticine and Derivatives as Chemotherapy Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **3**(2), 67–76. <https://doi.org/10.2174/1389557033405377>
- Harrison, Michael A. a Muench, Steven P., 2018. The Vacuolar ATPase - A Nano-scale Motor That Drives Cell Biology. *Sub-cellular biochemistry*. **87**, 409–459. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_14
- He, Jing, Shi, Xiao Yan, Li, Zhi Min, Pan, Xiao Hua, Li, Ze Lian, Chen, Ying, Yan, Shi Jie a Xiao, Lan, 2019. Proton pump inhibitors can reverse the YAP mediated paclitaxel resistance in epithelial ovarian cancer. *BMC Molecular and Cell Biology*. **20**(49), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0227-y>
- Hendrix, An, Sormunen, Raija, Westbroek, Wendy, Lambein, Kathleen, Denys, Hannelore, Sys, Gwen, Braems, Geert, Van Den Broecke, Rudy, Cocquyt, Veronique, Gespach, Christian, Bracke, Marc a De Wever, Olivier, 2013. Vacuolar H⁺ ATPase expression and activity is required for Rab27B-dependent invasive growth and metastasis of breast cancer. *International Journal of Cancer*. **133**(4), 843–854. <https://doi.org/10.1002/ijc.28079>
- Hoffmann, Inga, Roatsch, Martin, Schmitt, Martin L, Carlino, Luca, Pippel, Martin, Sippl, Wolfgang a Jung, Manfred, 2012. The role of histone demethylases in cancer therapy. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.07.004>
- Hofmanová, Jiřina, 2013. Genotoxicita a karcinogeneze. *Genotoxicita a karcinogeneze*. Dostupné z: <https://is.muni.cz/elportal/?id=1126513>

Hraběta, Jan, Belhajová, Marie, Šubrtová, Hana, Rodrigo, Miguel Angel Merlos, Heger, Zbyněk a Eckschlager, Tomáš, 2020. Drug sequestration in lysosomes as one of the mechanisms of chemoresistance of cancer cells and the possibilities of its inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21124392>

Hrabeta, Jan, Groh, Tomas, Khalil, Mohamed Ashraf, Poljakova, Jitka, Adam, Vojtech, Kizek, Rene, Uhlik, Jiri, Doktorova, Helena, Cerna, Tereza, Frei, Eva, Stiborova, Marie a Eckschlager, Tomas, 2015. Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells. *International Journal of Oncology*. **47**(3), 971–980. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3066>

Huang, Weijun, Hickson, LaTonya J, Eirin, Alfonso, Kirkland, James L a Lerman, Lilach O, 2022. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nature Reviews Nephrology*. **18**(10), 611–627. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00601-z>

Hughes, Timothy a Rusten, Tor Erik, 2013. Origin and Evolution of Self-Consumption: Autophagy. In: *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton*. New York, NY: Springer New York, s. 111–118. ISBN 978-0-387-74020-1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6274/>

Irwin, Meredith S., Naranjo, Arlene, Zhang, Fan F., Cohn, Susan L., London, Wendy B., Gastier-Foster, Julie M., Ramirez, Nilsa C., Pfau, Ruthann, Reshmi, Shalini, Wagner, Elizabeth, Nuchtern, Jed, Asgharzadeh, Shahab, Shimada, Hiroyuki, Maris, John M., Bagatell, Rochelle, Park, Julie R. a Hogarty, Michael D., 2021. Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. **39**(29), 3229–3241. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.00278>

Janoueix-Lerosey, Isabelle, Lequin, Delphine, Brugières, Laurence, Ribeiro, Agnès, De Pontual, Loïc, Combaret, Valérie, Raynal, Virginie, Puisieux, Alain, Schleiermacher, Gudrun, Pierron, Gaëlle, Valteau-Couanet, Dominique, Frebourg, Thierry, Michon, Jean, Lyonnet, Stanislas, Amiel, Jeanne a Delattre, Olivier, 2008. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. **455**(7215), 967–970. <https://doi.org/10.1038/NATURE07398>

Kane, Patricia M., 2012. Targeting Reversible Disassembly as a Mechanism of Controlling V-ATPase Activity. *Current Protein & Peptide Science*. **13**(2), 117–123. <https://doi.org/10.2174/138920312800493142>

Karbownik, Agnieszka, Szaelk, Edyta, Urjasz, Hanna, Gełboka, Aleksandra, Mierzwa, Emilia a Grzeskowiak, Edmund, 2012. The physical and chemical stability of cisplatin (Teva) in concentrate and diluted in sodium chloride 0.9%. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*. **16**(5), 435–439. <https://doi.org/10.5114/WO.2012.31775>

Kimmelman, Alec C. a White, Eileen, 2017. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism*. **25**(5), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.004>

Klener, Pavel a Klener, Pavel jr., 2010. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-2808-7. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/nova-protinadorova-leciva-a-lecebne-strategie-v-onkologii-323/>

Kreissman, Susan G., Seeger, Robert C., Matthay, Katherine K., London, Wendy B., Sposto, Richard, Grupp, Stephan A., Haas-Kogan, Daphne A., LaQuaglia, Michael P., Yu, Alice L., Diller, Lisa, Buxton, Allen, Park, Julie R., Cohn, Susan L., Maris, John M., Reynolds, C. Patrick a Villablanca, Judith G., 2013. Purged versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. **14**(10), 999–1008. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70309-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70309-7)

Krejčí, Denisa, Mužík, Jan a Dušek, Ladislav, 2021. *Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice Autorský kolektiv*. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008447/novotvary2019-2021.pdf>

Krejci, Denisa, Zapletalova, Michaela, Svobodova, Ivana, Bajciova, Viera, Mudry, Peter, Smelhaus, Vratislav, Sterba, Jaroslav, Stary, Jan, Capocaccia, Riccardo a Dusek, Ladislav, 2020. Childhood cancer epidemiology in the Czech Republic (1994–2016). *Cancer Epidemiology*. **69**(:101848), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2020.101848>

Krystal, Julie a Foster, Jennifer H., 2023. Treatment of High-Risk Neuroblastoma. *Children*. **10**(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/children10081302>

- Kulshrestha, Arpita, Katara, Gajendra K., Ginter, Jordyn, Pamorthy, Sahithi, Ibrahim, Safaa A., Jaiswal, Mukesh K., Sandulescu, Corina, Periakaruppan, Ramayee, Dolan, James, Gilman-Sachs, Alice a Beaman, Kenneth D., 2016. Selective inhibition of tumor cell associated Vacuolar-ATPase „a2" isoform overcomes cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Molecular Oncology*. **10**(6), 789–805. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.003>
- Kumari, Ruchi a Jat, Parmjit, 2021. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. **9**(:645593), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
- Kuskucu, M., Akyildiz, V., Kulmány, Ergün, Y., Zencir, S., Zupko, I., Durdagi, S., Zaka, M., Sahin, K., Orhan, H. a Topcu, Z., 2020. Structural modification of ellipticine derivatives with alkyl groups of varying length is influential on their effects on human DNA topoisomerase II: a combined experimental and computational study. *Medicinal Chemistry Research*. **29**(2), 189–198. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02472-9>
- LaBrosse, Elwood H., Comoy, Etienne, Bohuon, Claude, Zucker, Jean Michel a Schweisguth, Odile, 1976. Catecholamine metabolism in neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*. **57**(3), 633–643. <https://doi.org/10.1093/JNCI/57.3.633>
- Liu, Pengfei, Chen, Haijiao, Han, Lanxiu, Zou, Xiaoping a Shen, Weidong, 2015. Expression and role of V1A subunit of V-ATPases in gastric cancer cells. *International Journal of Clinical Oncology*. **20**(4), 725–735. <https://doi.org/10.1007/s10147-015-0782-y>
- Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, Lewis A. a Randall, Rose J., 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*. **193**(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lu, Qiang, Lu, Sha, Huang, Lijun, Wang, Ting, Wan, Yi, Zhou, Chang Xi, Zhang, Cunhai, Zhang, Zhipei a Li, Xiaofei, 2013. The expression of V-ATPase is associated with drug resistance and pathology of non-small-cell lung cancer. *Diagnostic Pathology*. **8**(:145), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-145>
- Maher, Megan J., Akimoto, Satoru, Iwata, Momi, Nagata, Koji, Hori, Yoshiko, Yoshida, Masasuke, Yokoyama, Shigeyuki, Iwata, So a Yokoyama, Ken, 2009. Crystal structure of A3B3 complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *The EMBO journal*. **28**(23), 3771–3779.

<https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2009.310>

Maris, John M., 2010. Recent Advances in Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. **362**(23), 2202–2211. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804577>

Maris, John M., Mosse, Yael P., Bradfield, Jonathan P., Hou, Cuiping, Monni, Stefano, Scott, Richard H., Asgharzadeh, Shahab, Attiyeh, Edward F., Diskin, Sharon J., Laudenslager, Marci, Winter, Cynthia, Cole, Kristina A., Glessner, Joseph T., Kim, Cecilia, Frackelton, Edward C., Casalunovo, Tracy, Eckert, Andrew W., Capasso, Mario, Rappaport, Eric F., McConville, Carmel, London, Wendy B., Seeger, Robert C., Rahman, Nazneen, Devoto, Marcella, Grant, Struan F.A., Li, Hongzhe a Hakonarson, Hakon, 2008. Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. **358**(24), 2585–2593. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0708698>

Mazánek, Pavel, 2016. Perinatal neuroblastoma. *Onkologie*. **10**(5), 210–214. <https://doi.org/10.36290/xon.2016.045>

Medina, Diego L., Di Paola, Simone, Peluso, Ivana, Armani, Andrea, De Stefani, Diego, Venditti, Rossella, Montefusco, Sandro, Scotto-Rosato, Anna, Prezioso, Carolina, Forrester, Alison, Settembre, Carmine, Wang, Wuyang, Gao, Qiong, Xu, Haoxing, Sandri, Marco, Rizzuto, Rosario, De Matteis, Maria Antonietta a Ballabio, Andrea, 2015. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature cell biology*. **17**(3), 288–299. <https://doi.org/10.1038/NCB3114>

Merlos Rodrigo, Miguel Angel, Buchtelova, Hana, De Los Rios, Vivian, Casal, José Ignacio, Eckschlager, Tomas, Hrabeta, Jan, Belhajova, Marie, Heger, Zbynek a Adam, Vojtech, 2019. Proteomic Signature of Neuroblastoma Cells UKF-NB-4 Reveals Key Role of Lysosomal Sequestration and the Proteasome Complex in Acquiring Chemoresistance to Cisplatin. *Journal of Proteome Research*. **18**(3), 1255–1263. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00867>

Merlos Rodrigo, Miguel Angel, Jimenez Jimenez, Ana Maria, Haddad, Yazan, Bodoor, Khaldon, Adam, Pavlina, Krizkova, Sona, Heger, Zbynek a Adam, Vojtech, 2020. Metallothionein isoforms as double agents – Their roles in carcinogenesis, cancer progression and chemoresistance. *Drug Resistance Updates*. **52**(:100691), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2020.100691>

- Mi, Xiangquan, Wang, Chunming, Sun, Chao, Chen, Xu, Huo, Xiang, Zhang, Yiming, Li, Gang, Xu, Bo, Zhang, Jun, Xie, Jianxin, Wang, Zhenhua a Li, Ji, 2017. Xanthohumol induces paraptosis of leukemia cells through p38 mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Oncotarget*. **8**(19), 31297–31304. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16185>
- Miranda, Kevin C., Karet, Fiona E. a Brown, Dennis, 2010. An Extended Nomenclature for Mammalian V-ATPase Subunit Genes and Splice Variants. *PLoS ONE*. **5**(3), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009531>
- Mossé, Yaël P., Laudenslager, Marci, Longo, Luca, Cole, Kristina A., Wood, Andrew, Attiyeh, Edward F., Laquaglia, Michael J., Sennett, Rachel, Lynch, Jill E., Perri, Patrizia, Laureys, Geneviève, Speleman, Frank, Kim, Cecilia, Hou, Cuiping, Hakonarson, Hakon, Torkamani, Ali, Schork, Nicholas J., Brodeur, Garrett M., Tonini, Gian P., Rappaport, Eric, Devoto, Marcella a Maris, John M., 2008. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. **455**(7215), 930–935. <https://doi.org/10.1038/NATURE07261>
- Nishisho, Toshihiko, Hata, Kenji, Nakanishi, Masako, Morita, Yoshihiro, Sun-Wada, Ge Hong, Wada, Yoh, Yasui, Natsuo a Yoneda, Toshiyuki, 2011. The a3 isoform vacuolar type H⁺-ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells. *Molecular Cancer Research*. **9**(7), 845–855. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0449>
- Ohta, T., Numata, M., Yagishita, H., Futagami, F., Tsukioka, Y., Kitagawa, H., Kayahara, M., Nagakawa, T., Miyazaki, I., Yamamoto, M., Iseki, S. a Ohkuma, S., 1996. Expression of 16 kDa proteolipid of vacuolar-tgpe H⁺-ATPase in human pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*. **73**(12), 1511–1517. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.285>
- Olechnowicz, Sam W.Z., Fedele, Anthony O. a Peet, Daniel J., 2012. Hypoxic Induction of the Regulator of G-Protein Signalling 4 Gene Is Mediated by the Hypoxia-Inducible Factor Pathway. *PLoS ONE*. **7**(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044564>
- Osowski, Christine M. a Urano, Fumihiko, 2011. Measuring ER Stress and the Unfolded Protein Response Using Mammalian Tissue Culture System. In: *Methods in Enzymology*. s. 71–92. ISBN 9780123851147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0>

- Palmieri, Michela, Impey, Soren, Kang, Hyojin, Di Ronza, Alberto, Pelz, Carl, Sardiello, Marco a Ballabio, Andrea, 2011. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human molecular genetics*. **20**(19), 3852–3866. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDR306>
- Paolini, Lucia, Hussain, Sajjad a Galardy, Paul J., 2022. Chromosome instability in neuroblastoma: A pathway to aggressive disease. *Frontiers in Oncology*. **12**(:988972), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.988972>
- Peinemann, Frank, Van Dalen, E. C. a Berthold, F., 2016. Rapid COJEC Induction Therapy for High-risk Neuroblastoma Patients - Cochrane Review. *Klinische Padiatrie*. **228**(3), 130–134. <https://doi.org/10.1055/S-0042-103158>
- Pérez-Sayáns, Mario, Reboiras-López, María Dolores, Somoza-Martín, José Manuel, Barros-Angueira, Francisco, Diz, Pilar Gayoso, Rey, José Manuel Gándara a García-García, Abel, 2010. Measurement of ATP6V1C1 expression in brush cytology samples as a diagnostic and prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biology and Therapy*. **9**(12), 1057–1064. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.12.11880>
- Pfaffl, Michael W., Horgan, Graham W. a Dempfle, Leo, 2002. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. **30**(9), 36e – 36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Pistritto, Giuseppa, Trisciuglio, Daniela, Ceci, Claudia, Alessia Garufi a D’Orazi, Gabriella, 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. **8**(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/AGING.100934>
- Procházka, Pavel, Libra, Antonín, Zemanová, Zuzana, Hřebačková, Jana, Poljaková, Jitka, Hraběta, Jan, Bunček, Martin, Stiborová, Marie a Eckschlager, Tomáš, 2012. Mechanisms of ellipticine-mediated resistance in UKF-NB-4 neuroblastoma cells. *Cancer Science*. **103**(2), 334–341. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02137.x>
- Qiu, Bo a Matthay, Katherine K., 2022. Advancing therapy for neuroblastoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. **19**(8), 515–533. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00643-z>

Saftig, Paul, Schröder, Bernd a Blanz, Judith, 2010. Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions. *Biochemical Society transactions*. **38**(6), 1420–1423. <https://doi.org/10.1042/BST0381420>

Santos-Pereira, Cátia, Rodrigues, Lúcia R. a Côrte-Real, Manuela, 2021. Emerging insights on the role of V-ATPase in human diseases: Therapeutic challenges and opportunities. *Medicinal Research Reviews*. **41**(4), 1927–1964. <https://doi.org/10.1002/med.21782>

Sennoune, Souad R., Bakunts, Karina, Martínez, Gloria M., Chua-Tuan, Jenny L., Kebir, Yamina, Attaya, Mohamed N. a Martínez-Zaguilán, Raul, 2004. Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **286**(6), 1443–1452. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00407.2003>

Siegel, Rebecca L., Miller, Kimberly D. a Jemal, Ahmedin, 2020. Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*. **70**(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21590>

Skarkova, Veronika, Kralova, Vera, Vitovcova, Barbora a Rudolf, Emil, 2019. Selected Aspects of Chemoresistance Mechanisms in Colorectal Carcinoma—A Focus on Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Autophagy, and Apoptosis. *Cells*. **8**(234), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cells8030234>

Sosa, Venus, Moliné, Teresa, Somoza, Rosa, Paciucci, Rosanna, Kondoh, Hiroshi a LLeonart, Matilde E., 2013. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*. **12**(1), 376–390. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2012.10.004>

Speelmans, Gea, Staffhorst, Rutger W.H.M., Versluis, Kees, Reedijk, Jan a De Kruijff, Ben, 1997. Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes. *Biochemistry*. **36**(34), 10545–10550. <https://doi.org/10.1021/bi9703047>

Sperandio, Sabina, De Belle, Ian a Bredesen, Dale E., 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(26), 14376–14381. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14376>

Sperandio, Sabina, Poksay, Karen, De Belle, Ian, Lafuente, Maria J., Liu, Bigang, Nasir, Jamal a Bredesen, Dale E., 2004. Paraptosis: Mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death and Differentiation*. **11**(10), 1066–1075. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401465>

Stiborová, Marie, Borek-Dohalská, Lucie, Aimová, Dagmar, Kotrbová, Věra, Kukačková, Karolína, Janouchová, Kateřina, Rupertová, Martina, Ryšlavá, Helena, Hudeček, Jiří a Frei, Eva, 2006. Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes - similarity between human and rat systems. *General physiology and biophysics*. **25**(3), 245–61. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17197724>

Stransky, Laura, Cotter, Kristina a Forgac, Michael, 2016. The function of v-atpases in cancer. *Physiological Reviews*. **96**(3), 1071–1091. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2015>

Takeuchi, Kenji a Ito, Fumiaki, 2011. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **34**(12), 1774–1780. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1774>

Tchounwou, Paul B., Dasari, Shaloam, Noubissi, Felicite K., Ray, Paresh a Kumar, Sanjay, 2021. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*. **13**, 303–328. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267383>

Terrasi, Andrea, Bertolini, Irene, Martelli, Cristina, Gaudioso, Gabriella, Di Cristofori, Andrea, Storaci, Alessandra Maria, Formica, Miriam, Bosari, Silvano, Caroli, Manuela, Ottobrini, Luisa, Vaccari, Thomas a Vaira, Valentina, 2019. Specific V-ATPase expression sub-classifies IDHwt lower-grade gliomas and impacts glioma growth in vivo. *EBioMedicine*. **41**, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.052>

Toei, Masashi, Saum, Regina a Forgac, Michael, 2010. Regulation and Isoform Function of the V-ATPases. *Biochemistry*. **49**(23), 4715–4723. <https://doi.org/10.1021/bi100397s>

Trochet, Delphine, Bourdeaut, Franck, Janoueix-Lerosey, Isabelle, Deville, Anne, De Pontual, Loïc, Schleiermacher, Gudrun, Coze, Carole, Philip, Nicole, Frébourg, Thierry, Munnich, Arnold, Lyonnet, Stanislas, Delattre, Olivier a Amiel, Jeanne, 2004. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *American journal of human genetics*. **74**(4), 761–764. <https://doi.org/10.1086/383253>

Tsubota, Shoma a Kadomatsu, Kenji, 2018. Origin and initiation mechanisms of neuroblastoma. *Cell and Tissue Research*. **372**(2), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2796-z>

Tuli, Farzana a Kane, Patricia M., 2023. The cytosolic N-terminal domain of V-ATPase α -subunits is a regulatory hub targeted by multiple signals. *Frontiers in Molecular Biosciences*. **10**, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1168680>

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2019. *Epidemiologie nádorů u dětí a mladistvých na interaktivním webovém portálu*. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=aktuality&aid=8350>

Vandesompele, Jo, Van Roy, Nadine, Van Gele, Mireille, Laureys, Geneviève, Ambros, Peter, Heimann, Pierre, Devalck, Christine, Schuuring, Ed, Brock, Penelope, Otten, Jacques, Gyselinck, Jan, Paepe, Anne De a Speleman, Frank, 1998. Genetic heterogeneity of neuroblastoma studied by comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes and Cancer*. **23**(2), 141–152. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199810\)23:2<141::AID-GCC7>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199810)23:2<141::AID-GCC7>3.0.CO;2-2)

Vyzula, Rostislav, Němeček, Radim a Sláma, Ondřej, 2018. *Klinická onkologie pro mediky, Solidní nádory a nádory dětského věku*. Dostupné z: <https://portal.med.muni.cz/clanek-661-klinicka-onkologie-pro-mediky-solidni-nadory-a-nadory-detskeho-veku.html>

Wang, Longfei, Wu, Di, Robinson, Carol V., Wu, Hao a Fu, Tian-Min, 2020. Structures of a Complete Human V-ATPase Reveal Mechanisms of Its Assembly. *Molecular Cell*. **80**(3), 501–511. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.029>

Xu, Yanqing, Parmar, Amanda, Roux, Emmanuelle, Balbis, Alejandro, Dumas, Victor, Chevalier, Stephanie a Posner, Barry I., 2012. Epidermal Growth Factor-induced Vacuolar (H⁺)-ATPase Assembly. *Journal of Biological Chemistry*. **287**(31), 26409–26422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.352229>

Yang, Annan a Kimmelman, Alec C., 2014. Inhibition of autophagy attenuates pancreatic cancer growth independent of TP53/TRP53 status. *Autophagy*. **10**(9), 1683–1684. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0362>

Yang, Hong Wei, Chen, Ying Zhang, Takita, Junko, Soeda, Eiichi, Piao, Hui Ying a Hayashi, Yasuhide, 2001. Genomic structure and mutational analysis of the human KIF1B gene which is homozygously deleted in neuroblastoma at chromosome 1p36.2. *Oncogene*. **20**(36), 5075–5083. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204456>

- Yang, Junsheng, Zhao, Zhuangzhuang, Gu, Mingxue, Feng, Xinghua a Xu, Haoxing, 2019. Release and uptake mechanisms of vesicular Ca²⁺ stores. *Protein and Cell*. **10**(1), 8–19. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0523-x>
- Yang, Zhifen a Klionsky, Daniel J., 2009. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **335**(1), 1–32. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_1
- Zhang, Zhao, Liu, Xincheng, Cheng, Debin, Dang, Jingyi, Mi, Zhenzhou, Shi, Yubo, Wang, Lei a Fan, Hongbin, 2022. Unfolded Protein Response–Related Signature Associates With the Immune Microenvironment and Prognostic Prediction in Osteosarcoma. *Frontiers in Genetics*. **13**(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.911346>
- Zhang, Zhenyu, Zheng, Yesha, Mazon, Hortense, Milgrom, Elena, Kitagawa, Norton, Kish-Trier, Erik, Heck, Albert J.R., Kane, Patricia M. a Wilkens, Stephan, 2008. Structure of the yeast vacuolar ATPase. *The Journal of biological chemistry*. **283**(51), 35983–35995. <https://doi.org/10.1074/JBC.M805345200>
- Zheng, Hua-Chuan, 2017. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*. **8**(35), 59950–59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>
- Zhitomirsky, Benny a Assaraf, Yehuda G., 2016. Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*. **24**, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.11.004>
- Zhitomirsky, Benny a Assaraf, Yehuda G., 2017. Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis. *Oncotarget*. **8**(28), 45117–45132. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15155>