

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Expresse inhibičního faktoru migrace makrofágů u
neuroblastomových buněčných linií**

**The expression of macrophage migration inhibitory factor in
neuroblastoma cell lines**

Bakalářská práce

Daniela Polatová

Vedoucí práce: RNDr. Jitka Poljaková, Ph.D.

Praha 2015

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Jitky Poljakové, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze, dne:

Podpis:

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za čas, který mi věnovala, a za trpělivost, ochotu a velmi cenné rady a náměty, které mi v průběhu vytváření této práce poskytla. Můj dík patří také RNDr. Michaele Moserové, Ph.D. za pomoc při provádění experimentální části této práce.

Děkuji též své rodině a blízkým za podporu, pochopení a vlídné slovo nejen při psaní této práce, ale i v průběhu celého dosavadního studia.

Abstrakt

Inhibiční faktor migrace makrofágů (MIF) je cytokin, který se přímo účastní imunitních reakcí organismu vyvolaných vnějším podnětem, např. lipopolysacharidy bakterií nebo glukokortikoidy. Na základě stimulace těmito látkami je MIF uvolňován z makrofágů. Sám aktivuje další makrofágy a T-lymfocyty a umožňuje tak uvolnění protizánětlivých cytokinů. Podílí se též na angiogenezi, neboť endogenně produkováný MIF je naprosto nezbytný pro proliferaci endoteliálních buněk. K tvorbě nových cév stimulované MIF dochází i u nádorů, což vede k jejich růstu. Přírodním receptorem pro MIF je integrální membránový protein CD74, který může být vystaven na povrchu buněk. Pokud je vystaven na povrchu T-lymfocytů, může být modifikován chondroitin-sulfátem a interagovat s proteinem CD44, což je důležité k efektivní aktivaci T-buněk. Na komplex CD74-CD44 se poté váže MIF. V rámci této bakalářské práce byla studována přítomnost CD74 v lidských neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Elektroforézou a následnou metodou „Western blot“ byla detekována přítomnost CD74 v linii UKF-NB-4, v linii UKF-NB-3 CD74 detekován nebyl. Přítomnost CD74 v neuroblastomových buněčných liniích indikuje, že i neuroblastomy mohou být ovlivňovány MIF.

Klíčová slova: MIF, CD74, neuroblastom, tkáňové kultivace, Western blot

Abstract

A macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a cytokine which participates in immune responses induced by outer stimuli such as lipopolysaccharides of bacteria or glucocorticoids. It is produced mainly by macrophages. It activates other macrophages and T-lymphocytes and allows anti-inflammatory cytokines to be released. It contributes to angiogenesis - endogenously produced MIF is crucial for the proliferation of endothelial cells. The formation of new blood vessels stimulated by MIF was also described in tumors and it leads to tumor growth. The natural receptor for MIF is an integral membrane protein CD74, which could be presented on the cell surface. If it is presented on the surface of T-lymphocytes, it could be modified by chondroitin-sulphate and interact with a protein CD44. This modification and interaction is important for an effective activation of T-cells. MIF then binds to the complex CD74-CD44. The presence of CD74 in human neuroblastoma cell lines UKF-NB-3 and UKF-NB-4 was studied in this bachelor thesis. Using electrophoresis and Western blot CD74 was detected in the UKF-NB-4 neuroblastoma cell line but it wasn't detected in the UKF-NB-3 neuroblastoma cell line. Nevertheless, the presence of this receptor in neuroblastoma cells indicates, that even neuroblastomas could be influenced by MIF via CD74.

(In Czech)

Keywords: MIF, CD74, neuroblastoma, tissue culture, Western blot

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod	11
2. Inhibiční faktor migrace makrofágů	12
2.1. Struktura a vlastnosti MIF.....	12
2.2. Role MIF v organismu.....	14
2.3. MIF a nádorová onemocnění	16
2.3.1. Stimulace růstu nádoru.....	16
2.3.2. Vliv MIF na T-buňky	17
3. Receptor CD74	18
3.1. Úloha CD74.....	19
3.2. CD74 jako receptor MIF.....	19
4. Neuroblastické nádory	21
4.1. Neuroblastomy	21
4.1.1. Dělení neuroblastomů	22
4.1.2. Onkogen MYCN.....	24
4.1.3. Transkripční cíl N-myc	26
5. Cíl práce	27
6. Materiál a metody	28
6.1. Materiál.....	28
6.1.1. Biologický materiál.....	28
6.1.2 Chemikálie.....	28
6.2. Metody	29
6.2.1. Pěstování buněk	29
6.2.2. Příprava vzorků	30
6.2.3. Izolace proteinů.....	30
6.2.4. Stanovení koncentrace proteinů.....	31
6.2.5. Elektroforéza	32
6.2.6. Přenos proteinů	32
7. Výsledky a diskuze	35

7.1. Stanovení koncentrace proteinů	36
7.2 Imunodetekce proteinů.....	38
8. Závěr.....	43
Seznam použité literatury.....	44

Seznam použitých zkratek

A/bisA	akrylamid/bis-akrylamid
anti-MIF	protilátka proti MIF
APS	peroxosíran amonný (z angl. amonium persulphate)
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát (z angl. 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)
Bcl-2	antiapoptotický protein (z angl. B Cell lymphoma 2)
Bcl-xL	antiapoptotický protein (z angl. B Cell lymphoma extra large)
bp	páry bazí (z angl. base pair)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CD44	z angl. Cluster of differentiation 44
CD74	z angl. Cluster of differentiation 74
cDNA	komplementární deoxybonukleová kyselina (z angl. complementary deoxyribonucleic acid)
c-myc	myelocystomatózní onkogen (z angl. myelocystomatosis oncogene)
ERK	z angl. extracellular signal-regulated kinases
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)
G ₀ -fáze	klidová fáze buněčného cyklu
G ₁ -fáze	růstová fáze buněčného cyklu (z angl. growth)
GAPDH	glyceraldehydfosfát dehydrogenasa (z angl. glyceraldehydphosphate dehydrogenase)
IFN- γ	interferon- γ
IL-15	interleukin 15

IL-1 β	interleukin 1 β
IL-2	interleukin 2
IL-8	interleukin 8
IMDM	z angl. Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INPC	mezinárodní klasifikace patologie neuroblastomů (z angl. International Neuroblastoma Pathology Classification)
INRGSS	mezinárodní klasifikační systém rizikových skupin neuroblastomů (z angl. International Neuroblastoma Risk Groups Staging System)
INSS	mezinárodní systém klasifikace neuroblastomů (z angl. International Neuroblastoma Staging System)
MAPK	z angl. Mitogen-activated protein kinases
Max	faktor X asociovaný s myc (z angl. myc-associated factor X)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
MIF	inhibiční faktor migrace makrofágů (z angl. macrophage migration inhibitory factor)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
MYCN	z angl. V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog
NBT	Nitro Blue Tetrazolium chlorid (z angl. Nitro Blue Tetrazolium Chloride)
NF- κ B	jaderný transkripční faktor (z angl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell)
N-myc	protein proto-onkogenu MYCN (z angl. N-myc proto.oncogene protein)

p21	protein o velikosti 21 kDa
p33	protein o velikosti 33 kDa
p35	protein o velikosti 35 kDa
p41	protein o velikosti 41 kDa
p43	protein o velikosti 43 kDa
p53	protein o velikosti 53 kDa
PBS	fosfátový pufr se zvýšenou iontovou silou (z angl. phosphate buffered saline)
pI	izoelektrický bod
Raf	z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	z angl. rat sarcoma
RIPA	pufr pro radioimunoprecipitační esej (z angl. radio-immunoprecipitation assay)
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulphate)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (z angl. sodium dodecylsulphate polacrylamide gel electrophoresis)
TAF(II)105	z angl. transcription initiation factor TFIID 105 kDa subunit
TBST	z angl. Tris-buffered saline with Tween
TEMED	tetramethylethylendiamin
TGF- β	transformující růstový faktor- β (z angl. transforming growth factor- β)
TNF- α	z angl. tumor necrosis factor α
Tris	tris(hexomethyl)aminomethan
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. Vascular endothelial growth factor)

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. Navzdory různým screeningovým a preventivním programům poskytovaným Ministerstvem zdravotnictví ČR ročně umírá v důsledku nádorového bujení až 27 tisíc osob. Ženy nejčastěji podléhají nádorům prsu a děložního hrdla, muži pak nádorům tlustého střeva [1, 2].

U dětských pacientů je nejčastějším nádorovým onemocněním leukémie, která se vyskytuje až v 35 % případů všech zhoubných onemocnění. Dále byl u dětí zaznamenán výskyt nádorů ledvin, jater, kostí, oka (retinoblastom), svalstva, cév, tukové a vazivové tkáně, mízního, pohlavního či nervového systému [3]. Jedním z nádorů nervového systému je i neuroblastom, který se vyskytuje až z 90 % u dětí mladších 10 let. Představuje až 10 % všech zhoubných nádorů u pacientů do 15 let a v České republice je každý rok diagnostikován u přibližně 20 až 25 nových pacientů [4].

Léčba dětí s diagnostikovaným neuroblastomem je však náročná, neboť klinická prognóza onemocnění je závislá na mnoha faktorech a úzce souvisí i s věkem pacienta. Vědecké studie prokázaly, že v neuroblastomech dochází ke zvýšené expresi inhibičního faktoru migrace makrofágů (MIF), který hraje významnou roli v imunitních odpovědích organismu [5]. Produkce tohoto cytokinu byla popsána i v jiných typech nádoru a na základě dalších experimentů byl MIF vyhodnocen jako potenciálně vhodný cíl terapeutického zásahu při léčbě nádorových onemocnění [6].

2. Inhibiční faktor migrace makrofágů

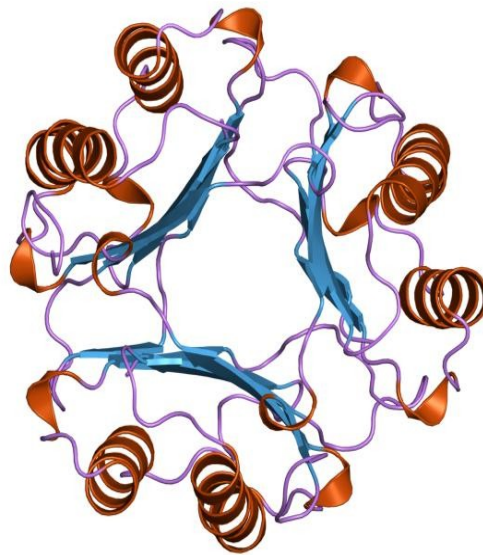
Inhibiční faktor migrace makrofágů (MIF) je protein, který je produkován různými tkáněmi včetně buněk imunitního systému. Tento cytokin byl objeven v roce 1966 jako látka produkovaná T-lymfocyty, která inhibuje migraci normálních peritoneálních buněk [7, 8]. Pokud totiž T-lymfocyty interagují se specifickým antigenem, produkují látky, které, ať už samy o sobě nebo v kombinaci s dalšími antigeny, působí na další přítomné buňky, například makrofágy, a inhibují jejich migraci [8]. MIF však neprodukují pouze T-lymfocyty, ale mohou jej tvořit například i hypofyzární buňky, které jsou vystaveny působení endotoxinů [9] nebo nádorové buňky [10]. Komplementární DNA (cDNA) kódující rekombinantní lidský MIF byla poprvé připravena v roce 1989 [11].

2.1. Struktura a vlastnosti MIF

MIF, úplně první popsaný cytokin, je protein tvořený 115 aminokyselinami [12]. Jeho molekulová hmotnost je $12\,347,26 \pm 4,05$ Da [13] a hodnota jeho isoelektrického bodu (pI) se pohybuje mezi 3,5 a 4. Protein je tepelně poměrně stálý - inkubace 30 minut při 56 °C nezpůsobila ztrátu jeho biologických vlastností [14].

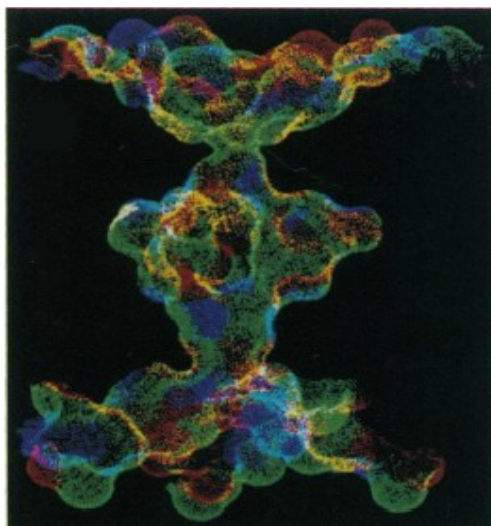
Z genetického hlediska je lidský inhibiční faktor migrace makrofágů kódován poměrně malým genem (1000 bp). Tento gen je složen z 3 exonů o velikosti 173, 183 a 205 bp, které jsou od sebe odděleny dvěma introny (95 a 189 bp). V lidském genomu byl popsán pouze jeden funkční gen pro MIF, na rozdíl od myšního genomu, kde bylo objeveno několik funkčních kopií tohoto genu. U savců je gen pro MIF podobně krátký jako ten lidský [15].

Ze strukturního hlediska je protein MIF trimer. Skládá se ze tří β -skládaných struktur formujících β -barel, které jsou obklopeny šesti α -helikálními strukturami. Trimerní uspořádání je tvořeno propletením smyček s krátkými β -řetězci mezi jednotlivými podjednotkami [12]. Struktura MIF je zobrazena na obrázku 1.



Obr. 1 - Struktura inhibičního faktoru migrace makrofágů. Oranžové smyčky zobrazují α -helix, modré šipky znázorňují β -skládanou strukturu. Převzato a upraveno z [73].

β -Barely tvoří kanál, který prostupuje středem celého proteinu a shoduje se s trojčetnou osou molekuly. Tento kanál má nepravidelný tvar - na otevřených koncích je široký až 15 Å, zatímco jeho nejužší místo je široké 3-4 Å. Boční pohled na molekulu MIF je znázorněn na obrázku 2 na straně 14.



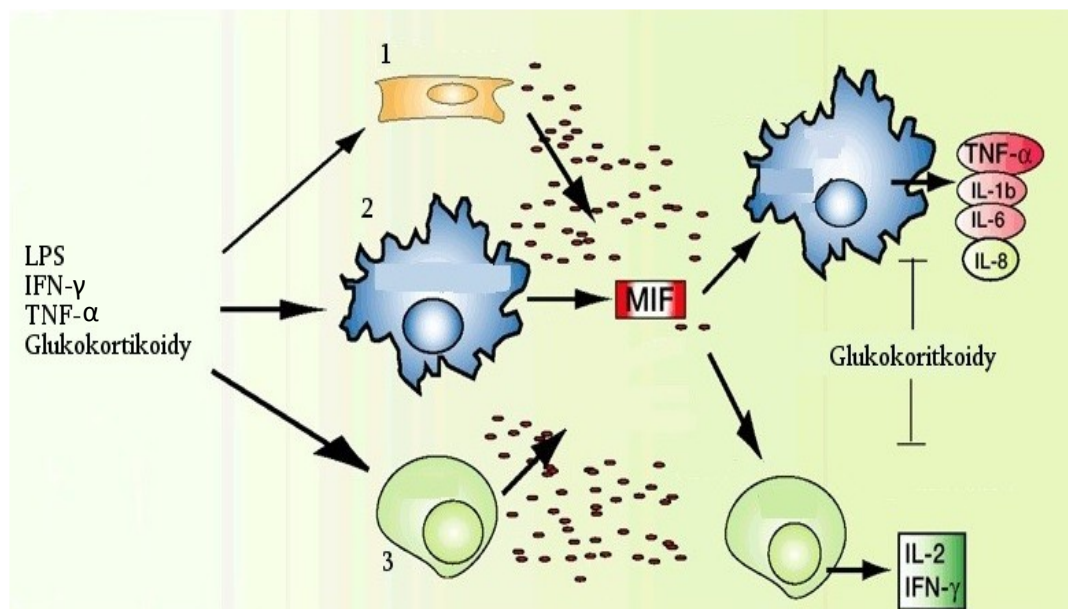
Obr. 2 - Boční pohled na molekulu MIF. Barevné oblasti znázorňují různé typy atomů: uhlík - zelená; dusík - modrá; kyslík - červená; síra - žlutá. Převzato a upraveno z [12].

2.2. Role MIF v organismu

Významným producentem tohoto proteinu jsou makrofágy. Oproti jiným cytokinům odvozeným od makrofágů, se v makrofázích vyskytuje velké množství již vyrobeného proteinu MIF a také jeho mRNA. Syntéza MIF je stimulována působením dalších cytokinů, jako je např. „ tumor necrosis factor α “ (TNF- α) nebo interferon- γ (INF- γ) [9].

Inhibiční faktor migrace makrofágů má mnoho funkcí, díky čemuž je hojně studován. Podílí se na tvorbě nových cév (angiogenezi) či tumorigenezi a je významným regulátorem imunitních odpovědí. Na základě stimulace z vnějšího prostředí (např. pomocí lipopolysacharidů nebo glukokortikoidů) jsou makrofágy, hypofyzární buňky a T-lymfocyty schopny uvolňovat MIF, který následně stimuluje uvolňování dalších cytokinů z T-lymfocytů a makrofágů [16, 17]. Dochází k potlačení inhibičního vlivu glukokortikoidů na expresi dalších cytokinů (např. TNF- α , IL-1 β či IL-8), které jsou následně produkovány [18].

Expresí MIF je nezbytnou součástí cesty vedoucí k aktivaci T-lymfocytů, produkci IL-2 a následné mitogenezi. Při aktivaci T-lymfocytů se produkuje velké množství jak proteinu MIF, tak i jeho mRNA a pokud je proliferace T-lymfocytů inhibována (např. protilátkou anti-MIF), nedochází ani k produkci cytokinu IL-2 [16]. Obecně lze tedy říci, že hlavním úkolem MIF uvolněného do okolí z makrofágů nebo T- buněk, je podpořit expresi cytokinů a spustit primární imunitní odpověď. Schématicky je produkce MIF a jeho vliv na další buňky znázorněna na obrázku 3.



Obr. 3 - Produkce MIF a jeho vliv na okolní buňky. LPS - lipopolysacharid; 1 - hypofyzární buňka; 2 - makrofág; 3 - T-lymfocyt; IFN-γ, TNF-α, IL-1b, IL-6, IL-8 - cytokiny. Převzato a upraveno z [74].

Podobnou úlohu hraje MIF i u bakteriálních infekcí, neboť jak Gram- pozitivní, tak Gram-negativní bakterie jsou schopné pomocí svých endotoxinů (Gram-negativní) nebo exotoxinů (Gram-pozitivní) vyvolat produkci MIF a stimulovat tak imunitní odpověď ve formě zánětlivého procesu [19].

MIF vykazuje též enzymovou aktivitu, jedná se o keto-enol tautomerasovou aktivitu. Studie prokázaly, že MIF izolovaný z oční čočky hovězího dobytka má stejnou velikost, pořadí prvních 15 aminokyselinových zbytků na N-konci i enzymatickou aktivitu jako komerčně dodávaná *p*-hydroxyfenylpyruvát tautomerasa. Substráty tohoto enzymu jsou fenylpyruvát a *p*-hydroxyfenylpyruvát, mezi kterými dochází působením MIF k tautomerní reakci [20].

2.3. MIF a nádorová onemocnění

Významná role, kterou MIF hraje v systému imunitních odpovědí, také úzce souvisí se vznikem a růstem nádorů.

2.3.1. Stimulace růstu nádoru

Inhibiční faktor migrace makrofágů je nezbytný pro buněčný růst nádorových buněk. Cytokiny, které jsou uvolňovány nádorem (např. transformující růstový faktor- β (TGF- β)), spolu s makrofágy asociovanými s nádorem, stimulují intracelulární produkci MIF a tak i růst nádoru [21]. Zvýšení koncentrace MIF v nádorových buňkách doprovází i nárůst koncentrace vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který stimuluje angiogenezi [22]. Právě neovaskularizace je jedním z klíčových procesů při maligním růstu nádoru [23]. Studie *in vitro* dokazují, že MIF je naprosto nezbytný pro proliferaci endoteliálních buněk. Chesney a kolektiv popsali, že pokud byly endoteliální buňky ošetřeny protilátkou anti-MIF, růst těchto buněk se zastavil a proliferace se nespustila ani poté, kdy byl k těmto buňkám přidán rekombinantně připravený MIF. Experimenty *in vivo* dokázaly, že u myší, které

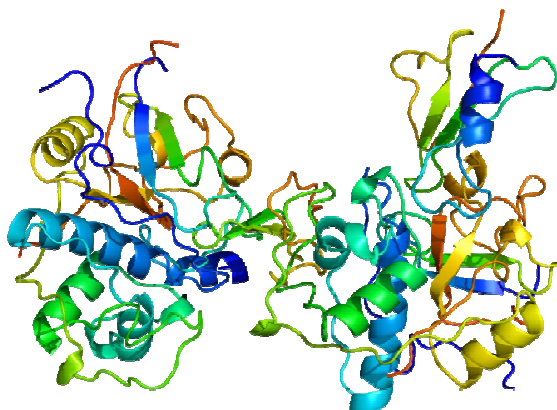
byly podrobeny terapii pomocí anti-MIF se rapidně snížila velikost i počet nových cév [24]. Díky tomuto vlivu se MIF stává potenciálním cílem pro léčbu nádorových onemocnění. Studie na neuroblastomových buňkách *in vivo* a *in vitro* dokázaly, že snížení exprese MIF vedlo k výraznému zmenšení proliferace neuroblastomových buněk a i k potlačení růstu a metastázování neuroblastomu [6].

2.3.2. Vliv MIF na T-buňky

Nádorem produkováný MIF má velký vliv na T-lymfocyty. Studie prokázaly, že MIF produkováný v myším neuroblastomu inhibuje proliferaci T-lymfocytů a blokuje jejich protinádorovou funkci [10]. Pokud je MIF produkováný ve velkém množství, oslabuje imunitní odpověď T-lymfocytů tím, že zabraňuje jejich aktivaci pomocí IL-2 či IL-15 a množení T-lymfocytů již aktivovaných. V aktivovaných T-lymfocytech indukuje buněčnou smrt pomocí stimulace sekrece dalších cytokinů, hlavně IFN- γ či TNF- α [25].

3. Receptor CD74

CD74 (z angl. Cluster of differentiation 74) je integrální membránový protein, který asociuje s proteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) druhé třídy. Jedná se o protein o molekulové hmotnosti 33 kDa [26], který se vyskytuje jak v membráně endoplasmatického retikula či Golgiho aparátu, tak i v samotné buněčné membráně. Jeho N-konec o délce 28 aminokyselinových zbytků zasahuje do cytoplasmy, transmembránový úsek obsahuje 24 aminokyselinových zbytků. Lumenální C-konec má přibližně 150 aminokyselinových zbytků [29, 30]. Struktura tohoto proteinu je znázorněna na obrázku 4. V lidských buňkách se tento protein může vyskytovat ve 4 isoformách (p33, p35, p41 a p43), které se liší posttranskripčními úpravami a alternativním sestřihem mRNA [29]. V organismu jsou exprimovány převážně isoformy p33 a p35, přičemž majoritní je isoforma p33, která, jakmile je syntetizována, opouští endoplasmatické retikulum, zatímco isoforma p35 v endoplasmatickém retikulu zůstává¹ [30, 31]



Obr. 4 - Struktura CD74. Spirály označují α -helixy, šipky znázorňují β -sekundární struktury. Převzato a upraveno z [75].

¹ V dřívějších publikacích se někdy isoformy p33, resp. p35, označují jako Iip31, resp. Iip33. Aby nedošlo k nedorozumění, je v této bakalářské práci použito označení, které v odborné literatuře převládá.

3.1. Úloha CD74

Protein CD74 asociuje s nově vzniklými proteiny MHC II. třídy v endoplasmatickém retikulu a podílí se tak na transportu proteinů z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu [30].

Část buněčného CD74 je vystavena na povrchu různých typů buněk včetně T-lymfocytů [32]. Aby došlo k účinné stimulaci imunitní odpovědi T-buněk, je nutné, aby CD74 na povrchu T-lymfocytů byl modifikován chondroitin-sulfátem a zároveň interagoval s proteinem CD44, který je též exprimovaný na povrchu T-lymfocytů [33, 34].

CD74 je také přímo zapojen do procesu zrání a diferenciaci B-lymfocytů, zprostředkovává signál, který tento proces spouští [35]. Na maturaci nezralých B-lymfocytů se podílí N-koncová část CD74. Dochází k aktivaci dráhy vedoucí k transkripci zprostředkované pomocí jaderného transkripčního faktoru NF- κ B, jehož koaktivátorem je transkripční iniciační faktor TAF(II)-105 [36].

3.2. CD74 jako receptor MIF

Vedle chaperonové funkce při transportu proteinů z endoplasmatického retikula slouží CD74 i jako přirozený povrchový receptor pro MIF. Vazba MIF na extracelulární doménu CD74 aktivuje signalizační kaskádu, která je asociovaná s proliferací buněk [37]. Jako signální složka komplexu MIF-CD74 pravděpodobně slouží protein CD44. Studie totiž prokázaly, že MIF stimuluje fosforylaci serinu v CD74 v závislosti na přítomnosti CD44, ačkoli přímá vazba mezi MIF a CD44 není známá [38].

Při vazbě MIF na komplex CD74-CD44 na povrchu B-lymfocytů dochází ke spuštění signalizační kaskády odpovědné za přežití buňky. Dochází k zesílení efektu NF- κ B a tak i ke zvýšení exprese transmembránových proteinů Bcl-xL (z angl. B Cell lymphoma extra large) a Bcl-2 (z angl. B Cell lymphoma 2), což vede k potlačení apoptosy (*in vitro* i *in vivo*) [39].

Vazba MIF na CD74 byla již popsána i u některých typů nádorových onemocnění, např. v nádorech prsu [40], prostaty [41], plic [42] či slinivky břišní [43]. V některých tumorech je exprese MIF a CD74 úzce spojená. Zároveň souvisí exprese tohoto páru se zvýšenou produkcí chemokinů asociovaných s nádorem, které stimulují angiogenezi, a tudíž i s větším prokrvením nádoru, jak je tomu třeba u nádoru plic [42].

Studie naznačují, že je-li CD74 v nádoru exprimován ve velkém množství, může zabraňovat prezentaci nádorových antigenů a tak potlačit imunitní reakci organismu [44]. U nádorů prostaty nebo slinivky se CD74 jeví jako potenciálně vhodný tumorový marker určující další průběh onemocnění [41, 43].

4. Neuroblastické nádory

Neuroblastické nádory jsou jedny z nejčastějších nádorů dětského věku. Obecně se jedná o embryonální nádory sympatického nervového systému odvozené z neurální lišty. Tyto nádory jsou velmi rozdílné ať už v biologickém, genetickém nebo morfologickém směru, a proto byly rozděleny do několika skupin systémem mezinárodní klasifikace patologie neuroblastomů (INPC) [45].

Řadí se sem:

- 1) neuroblastomy - s malým obsahem Schwannových buněk
- 2) ganglioneuroblastomy - s vysokým obsahem Schwannových buněk
- 3) ganglioneuromy - s převažujícím množstvím Schwannových buněk
- 4) nodulární ganglioneuroblastomy - směs tří předchozích [45].

4.1. Neuroblastomy

Neuroblastom je typ extrakraniálního nádoru nervové tkáně. Vytváří se z primitivních buněk sympatického nervového systému a často je lokalizován v paraspinální oblasti hrudníku či břicha. Jde o jeden z nejrozšířenějších nádorů vyskytujících se u dětí a batolat. Je zodpovědný přibližně za 15 % všech dětských úmrtí v důsledku rakovinného bujení [46, 47]. Obecně lze říci, že pokud je neuroblastom diagnostikován u dětí do jednoho roku věku, je možné jej odstranit včasným chirurgickým zásahem, případně drobnou dodatkovou léčbou. Oproti tomu u starších dětí, kterým byl neuroblastom diagnostikován, se často objevují rozsáhlé hematogenní metastázy a tito pacienti často i přes rozsáhlou a intenzivní léčbu umírají. Úmrtnost dětských pacientů je velmi závislá na typu a stadiu onemocnění, a na věku pacienta [46].

Podle systému mezinárodní klasifikace patologie neuroblastomů jsou neuroblastomy charakterizovány jako „Schwannian Stroma-Poor“, tedy takové, které obsahují málo Schwannových buněk. Takovéto nádory jsou tvořeny neuroblastickými buňkami, které vytvářejí shluky oddělené jemným, často neúplným stromatem, ve kterém nenarůstají Schwannovy buňky, případně rostou jen velmi omezeně [45].

Neuroblastomy, které mají příznivou klinickou prognózu, se často vyskytují u dětí do 1,5 roku věku a obvykle se jedná o málo diferencovaný podtyp neuroblastomu [48]. Většina buněk tohoto podtypu se jeví jako nediferencované, jen méně jak 5 % buněk z této kultury prokazuje cytomorfologické znaky diferenciaci směrem ke gangliím. Tento typ bývá lehce protkán nervovými vlákny [45]. U starších dětí jsou klinicky příznivé neuroblastomy méně časté [48].

Neuroblastomy s klinicky nepříznivou prognózou se často vyskytují u dětí starších jednoho roku. Vyznačují se vysokým počtem nádorových buněk v mitóze a zároveň v karyorrhexi a velkým počtem buněk tvořících tkáň (vysokou celularitou) [48].

4.1.1. Dělení neuroblastomů

Vzhledem k tomu, že posuzování neuroblastomů a následná léčba dětí s tímto onemocněním se v jednotlivých případech lišily, byl v roce 2008 vyvinut mezinárodní systém klasifikace těchto nádorů INRGSS (z angl. International Neuroblastoma Risk Groups Staging System). Dle tohoto systému můžeme neuroblastomy rozdělit do pěti kategorií, které jsou definovány sedmi rizikovými faktory. Těmito faktory jsou věk pacienta, amplifikace onkogenu

MYCN, stupeň diferenciacie tkáně, histologická kategorie, ploidie, aberace na dlouhém raménku chromosomu 11 (11q) a riziková skupina [49]. Jednotlivá stádia i zmíněné faktory jsou ukázány v tabulce 1.

Tab. 1 - Rozdělení neuroblastomů dle INRGSS. Stádia neuroblastomu jsou označena L1/L2, L1, L2 (jedná se o lokální nádor), M (nádory se vzdálenými metastázami) a MS (nádory s metastázami v kůži, játrech a/nebo v kostní dřeni). Označení "-" říká, že konkrétní faktor v daném případě nerozhoduje. Zkratka GN značí ganglioneurom a GNB je ganglioneuroblastom. Informace převzaty z [49].

Stádium	Věk pacienta (měsíce)	Amplifikace MYCN	Ploidie	Histologická kategorie	Aberace 11q	Diferenciacie	Riziková skupina
L1/L2	-	-	-	zrající GN GNB	-	-	velmi nízké riziko
L1	-	ne	-	všechny kromě zrajícího GN a GNB	-	-	velmi nízké riziko
		ano					vysoké riziko
L2	< 18	ne	-	všechny kromě zrajícího GN a GNB	ne	-	nízké riziko
					ano		střední riziko
	> 18	ne	-	GNB nodulární, neuroblastom	ne	ano	nízké riziko
					ano		střední riziko
					ne	málo/vůbec	střední riziko
					ano		vysoké riziko
M	< 18	ne	hyperdiploidní	-	-	-	nízké riziko
	< 12	ne	diploidní	-	-	-	střední riziko
	od 12 do 18	ne	diploidní	-	-	-	střední riziko
	< 18	ano	-	-	-	-	vysoké riziko
	> 18	-	-	-	-	-	vysoké riziko
MS	< 18	ne	-	-	ne	-	velmi nízké riziko
		ano	-	-	ano	-	vysoké riziko
		ano	-	-	-	-	vysoké riziko

Stádia M (nádory se vzdálenými metastázami) a MS (nádory s metastázami v kůži, játrech a/nebo v kostní dřeni) technicky odpovídají některým stádiím v dřívějším mezinárodním systému klasifikace neuroblastomů (INSS). Stádium M odpovídá dřívějšímu označení 4 - jedná se o jakýkoli primární nádor s

metastázami do vzdálených lymfatických uzlin, kostní dřeně, jater, kůže a/nebo dalších orgánů. Stádium MS odpovídá a rozšiřuje stádium 4S - primární lokalizovaný nádor, jehož metastázy jsou omezeny pouze na kůži, kostní dřeň a/nebo játra [49, 50]. Stádium 4S je neobvyklé tím, že jeho prognóza není na rozdíl od jiných nádorových onemocnění tak nepříznivá. Nádor je v tomto případě lokalizovaný a metastázy nezasahují do kostí. U tohoto stádia často dochází ke spontánní regresi nádoru [51, 52]. Ačkoli i mezi nádory ve stadiu 4S se mohou objevit některé s klinicky nepříznivou prognózou, i tak se tento typ nádoru řadí mezi tzv. „low-risk neuroblastoma“ (málo rizikové neuroblastomy s velmi dobrou prognózou) [53].

V centru zájmu velkého množství studií jsou ovšem ty neuroblastomy, které jsou charakterizovány jako vysoce rizikové (tzv. „high-risk neuroblastoma“). Tento typ se vyznačuje rozsáhlými metastázami a také hojně amplifikovaným onkogenem MYCN. Velmi často je diagnostikován u dětí starších 1 roku [46]. Současná léčba tohoto nádoru zahrnuje chemoterapii, radioterapii i transplantaci kostní dřeně. Pacienti, u nichž je léčba úspěšná, však často trpí dlouhodobými vedlejšími účinky, někdy dochází i k recidivě nemoci [54, 55].

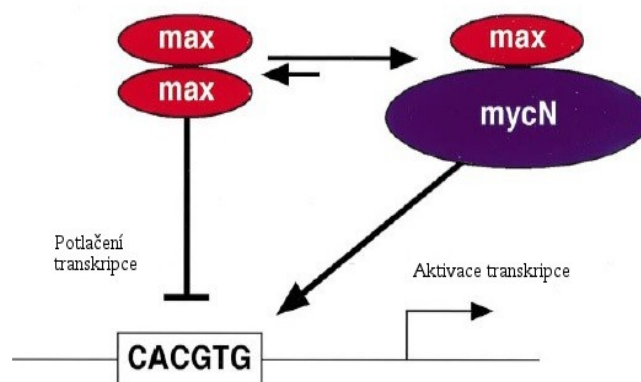
4.1.2. Onkogen MYCN

Nejvýznamnějším genem, který je v rámci neuroblastomů studován, je onkogen MYCN (z angl. v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog) a produkt jeho exprese onkoprotein N-myc. Jedná se o onkogen, který je běžně exprimován ve vyvíjejícím se nervovém systému [46] a amplifikace tohoto genu, případně zvýšená exprese proteinu N-myc byla detekována nejen v primárních neuroblastomech, ale i v retinoblastomech. Je patrné, že amplifikace MYCN souvisí s pozdějšími stádii

nemoci – u lokalizovaných nádorů detekován nebyl, ale u pozdějších rozvinutých stádií onemocnění byl exprimován až v 50 % [56, 57].

Velikost proteinu N-myc se pohybuje v rozmezí od 62 do 64 kDa – je totiž produkován ve dvou formách, které se liší o 2 kDa. Jedná se o fosfoprotein s poměrně krátkým poločasem života, který se nachází v jádře buňky a asociuje s jadernou matrix. Až 38 % jeho aminokyselinové sekvence se velmi podobá onkoproteinu c-myc [57].

Protein N-myc slouží jako transkripční faktor. Imunoprecipitační studie ukázaly, že aby mohl aktivovat transkripci genů stimulujících růst buňky, musí být navázaný na transkripční faktor Max (tzv. faktor X asociovaný s proteiny myc). Pokud je buňka v buněčném cyklu ve fázi G₀, pak je exprimováno velké množství proteinu Max a vznikají Max-Max homodimery, které blokují transkripci. Jakmile buňka vstoupí do buněčného cyklu (fáze G₁) nebo se začne exprimovat velké množství proteinu N-myc, dojde ke vzniku heterodimeru N-myc-Max, který transkripci genů stimulujících růst buňky spouští [58]. Regulace transkripce pomocí heterodimeru N-myc-Max je znázorněna na obrázku 5.



Obr. 5 - Regulace transkripce genů stimulujících růst buňky onkoproteinem N-myc. Heterodimer N-myc-Max spouští transkripci, homodimer Max-Max transkripci inhibuje. Převzato a upraveno z [46].

4.1.3. Transkripční cíl N-myc

Transkripčním cílem proteinu N-myc je tumorsupresorový protein p53 [59]. Tento protein funguje jako transkripční faktor, aktivuje např. transkripci genu pro protein p21, nicméně díky svému poměrně krátkému poločasu života (přibližně 20 minut) se v buňkách vyskytuje jen ve velmi malých množstvích [60]. Mimo jiné byl objeven v 50-55 % případů všech zkoumaných typů lidských nádorových onemocnění [61]. Obvykle se v nádorech vyskytuje jeho mutovaná forma, která je neaktivní, v neuroblastomech je však protein p53 mutován jen zřídka. Absence mutací v genu pro p53 v neuroblastomech tak naznačuje, že tyto mutace nejsou pro vývoj nemoci významné [59, 62].

p53 je exprimován převážně v buněčném jádře buněk neuroblastomu málo diferencovaného a nediferencovaného podtypu, kde byla též popsána zvýšená exprese N-myc. Exprese těchto dvou proteinů spolu úzce souvisí, neboť heterodimer N-myc-Max se váže na promotor genu pro p53 a tím jeho transkripci spouští [59].

5. Cíl práce

MIF je cytokin, jež je produkován různými typy buněk včetně buněk neuroblastomových. Pro tento protein byl popsán i jeho přirozený specifický receptor - tímto receptorem je integrální membránový protein CD74. Výskyt tohoto receptoru byl popsán nejen u buněk přirozeně se vyskytujících v organismu, ale i u buněk nádorových. Pokud by byla přítomnost CD74 potvrzena i u neuroblastomových buněčných linií, znamenalo by to, že i u tohoto typu nádoru se CD74 podílí na aktivaci signalizační dráhy vedoucí k proliferaci buněk. K aktivaci této dráhy dochází právě při vazbě MIF na extracelulární doménu CD74.

Cílem této bakalářské práce je pomocí vhodné metody určit, zda se v lidských neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 vyskytuje receptor CD74, který by mohl hrát roli v přenosu signálu MIF v neuroblastomech.

6. Materiál a metody

6.1. Materiál

6.1.1. Biologický materiál

Pro účely této bakalářské práce byly studovány lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4 získané darem od prof. MUDr. Jindřicha Činátla (Goetheho Univerzita, Centrum hygieny, Institut medicínské virologie), Frankfurt nad Mohanem, Německo.

6.1.2 Chemikálie

akrylamid	Serva
Anti-CD74 (primární protilátka)	Sigma Aldrich
Anti-GAPDH (primární protilátka)	Sigma Aldrich
Anti-rabbit (sekundární protilátka)	Sigma Aldrich
BCIP	Promega corporation
bisakrylamid	Serva
CBB	Sigma Aldrich
Complete (inhibitor proteas)	Roche
dodecylsulfát sodný	Carl Roth
ethanol	Lach:Ner
FBS	Lonza
glycin	Lach:Ner
chlorid hořečnatý	Lach:Ner
chlorid sodný	Lachema

IMDM medium	HyClone, Thermo Scientific
isopropylalkohol	Penta
kyselina octová	Lach:NER
L-glutamin	PAA the cell culture company
methanol	Penta
NBT	Promega corporation
PBS	Gibco, Life Technologies
peroxosíran amonný	BioRad
Ponceau	Loba-Chemie
standard molekulových hmotností	Thermo Scientific
standard molekulových hmotností	BioRad
sušené mléko	Laktino
TEMED	Serva
Tris base	Serva
trypsin	GE Health Care
Tween 20	Sigma Aldrich
vzorkový pufr Laemmli	BioRad

6.2. Metody

6.2.1. Pěstování buněk

Lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4 byly pěstovány v IMDM mediu, které bylo obohaceno o 10% fetální hovězí sérum (FBS) a 1% L-glutamin (200mM v zásobní lahvi). Buňky byly kultivovány v

inkubátoru (Shel Lab) při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂ a 95% vlhkostí vzduchu. Pasážování probíhalo vždy, když buňky porostly přibližně 80 % plochy kultivační lahvičky (obvykle každé 3-4 dny). Nejprve bylo z kultivační lahve odstraněno medium, buňky byly promyty sterilním PBS a uvolněny od stěny kultivační nádoby pomocí trypsinu (na buňky byl aplikován 1 ml (resp. 3 ml v závislosti na velikosti kultivační lahvičky) jeho 0,05 % roztoku v PBS)). Část buněk byla odebrána, popř. přenesena do nové kultivační lahve a po přidání kompletního IMDM media byly opět kultivovány v inkubátoru (Shel Lab) při 37 °C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti vzduchu.

6.2.2. Příprava vzorků

Pro izolaci proteinů a jejich následnou imunodetekci na nitrocelulosoové membráně byly buňky pěstovány na Petriho miskách o průměru 10 cm za stejných podmínek jako v kap. 6.2.1. . Jakmile porostly zhruba 80 % plochy misky, byly mechanicky uvolněny do media, centrifugovány 2 minuty při 1200 rpm a teplotě 25 °C (centrifuga Hettich Universal 320), peleta byla dvakrát resuspendována 1 ml PBS (po každé resuspendaci byla suspenze opět centrifugována za stejných podmínek) a nakonec byl supernatant odstraněn a peleta byla uchována v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

6.2.3. Izolace proteinů

Peleta neuroblastomových buněk byla resuspendována ve dvojnásobném objemu RIPA pufru (PBS; 1% Igepal CA; 0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS)

před použitím obohacným o inhibitor proteas Complete. Inkubace probíhala 60 minut na ledu. Vzorky byly poté 20 minut centrifugovány při 4 °C a 16000 rpm (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Supernatant byl přenesen do nových mikrozku mávek a uchován do dalšího použití v mrazicím boxu při -20 °C.

6.2.4. Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů izolovaných z pelet neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3 a UKF-NB-4 byla použita souprava „Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible“. Kromě slepých vzorků (dH₂O) byly na mikrotitrační destičku pipetovány kalibrační vzorky BSA vždy o objemu 9 µl. Použité koncentrace kalibračních vzorků byly 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 a 1,5 mg/ml. Kalibrační vzorky a slepé vzorky byly nanášeny vždy v dubletech. Stanovované vzorky byly nanášeny také v objemu 9 µl a byly 20x a 50x ředěné. Pro každé ředění byly pipetovány v tripletech. Následně bylo přidáno 260 µl pracovního pufru, který byl smíchán z reagentie A a reagentie B v poměru 50:1. Takto připravené vzorky byly inkubovány 30 minut při 37 °C v inkubátoru (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories). Po inkubaci byla ve vzorcích spektrofluorimetrem Tecan Infinite M200 Pro spektrofotometricky stanovena absorbance roztoků při 562 nm.

Vyhodnocení koncentrace proteinů v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky bylo provedeno pomocí programu KIM 32.

6.2.5. Elektroforéza

Elektroforéza je jedna z elektromigračních metod, která umožňuje rozdělení proteinů nebo nukleových kyselin v gelu působením elektrického pole. Má různá provedení - nativní elektroforéza nebo elektroforéza v agarosovém gelu. Pro rozdělení proteinů se velmi často používá tzv. SDS-PAGE, čili elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS. Dodecylsulfát sodný (SDS) proteinům zajišťuje shodný povrchový náboj (záporný), díky čemuž se pak proteiny mohou pohybovat v elektrickém poli pouze v závislosti na své velikosti.

Připravují se dva typy gelů - vrchní, zaostřovací a spodní, rozdělovací. Vrchní gel má vždy stejné složení a dochází v něm ke stabilizaci proteinů a zaostření jednotlivých zón. Spodní gel má různou koncentraci směsi akrylamid/bisakrylamid v závislosti na tom, jak velký je zkoumaný protein.

Pro elektroforézu (aparatura Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra cell) byl připraven 16% gel (1,5mM Tris (pH 8,8), 40% akrylamid (A/bisA = 29:1), 10% SDS, TEMED, 10% APS). Nanášené vzorky doplněné vzorkovým pufrem Laemmli a vařené 5 min ve vodní lázni obsahovaly 75 µg proteinů. Elektroforéza probíhala 70 minut při 20 mA/sklo.

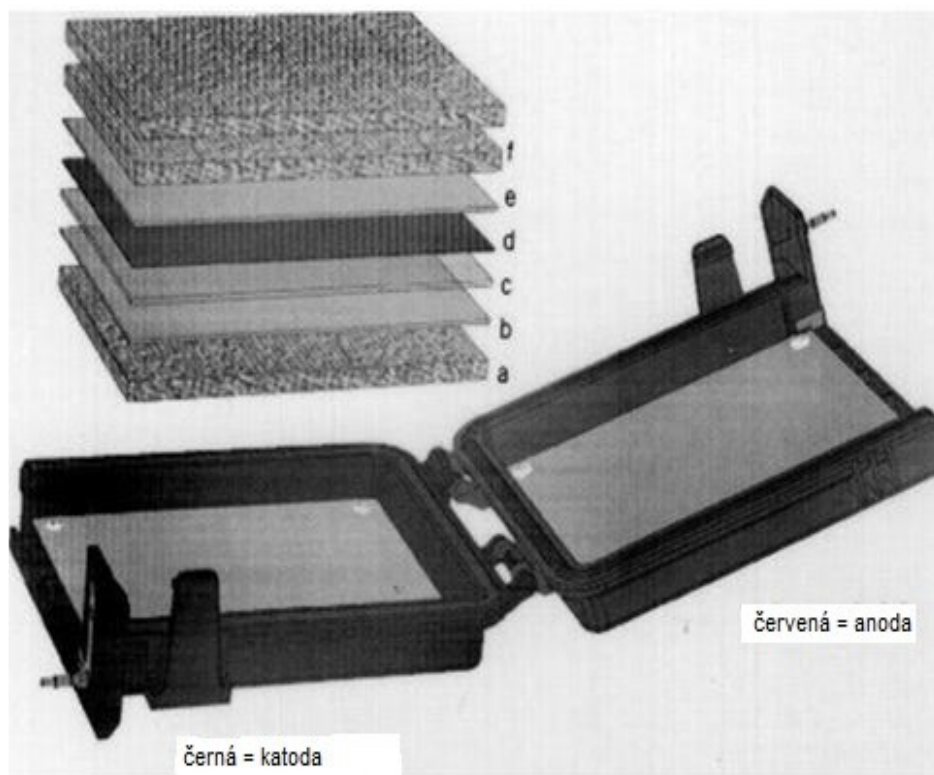
6.2.6. Přenos proteinů

Přenos proteinů, tzv. Western blot, je další z elektromigračních metod. V tomto případě se jedná o příčný přenos proteinů zachycených v gelu na nitrocelulosovou nebo polyvinylidendifluoridovou membránu. Vlivem elektrického pole se proteiny sorbují na povrch membrány a koncentrují se tam.

Tato metoda se často používá pro tzv. imunodetekce, kdy protein navázaný na membráně interaguje s primární protilátkou, na kterou se pak váže protilátka sekundární.

Metoda Western blot je analogií metody "Southern blot", kde se z gelu přenáší DNA. Obdobou je též "Northern blot", kdy jde o přenos RNA.

Přenos proteinů izolovaných z lidských neuroblastomových linií UKF-NB-3 a UKF-NB-4 z gelu na nitrocelulosovou membránu probíhal v kazetě znázorněné na obrázku. 6 (aparatura Hoefer miniVE). Gel i membrána byly před přenosem máčeny 10 minut v přenosovém pufru (25mM Tris; 193mM glycin) obohaceném o 10% methanol. Aparatura byla sestavena podle obrázku 6 a samotný přenos probíhal 90 minut při 350 mA.



Obr. 6 - Kazeta pro přenos proteinů. Katodou je černá deska, anodou je deska červená. Dále je znázorněno sestavení pěnových podložek (a; f), filtračních papírů (b; e), membrány (d) a gelu (c) [76]

Přenos proteinů na membránu byl kontrolován obarvením membrány Ponceau (0,5% roztok v CH₃COOH). Po odbarvení destilovanou vodou byla nitrocelulosa membrána blokována v 5% roztoku sušeného mléka v TBST (50mM Tris; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20; pH = 7,6) 1 hodinu na třepačce (ČSAV Vývojové dílny). Poté byla membrána inkubována s primární protilátkou Anti-CD74 ředěnou v 5% roztoku sušeného mléka v TBST v příslušném poměru (1:1000, 1:500 nebo 1:250) přes noc v chladící místnosti na třepačce (Mini Rocker MR-1, Biosan).

Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána pomocí přístroje SNAP i.d. Millipore třikrát promyta přibližně 5 ml TBST a poté inkubována se sekundární protilátkou (Anti-Rabbit), která byla naředěna do 0,1% roztoku sušeného mléka v TBST (ředění 2,1 µl protilátky do 3 ml roztoku sušeného mléka/TBST). Inkubace probíhala 10 minut. Poté byla membrána opět třikrát promyta TBST a převrstvena vyvolávacím roztokem NBT/BCIP (do 5 ml alkalického fosfatasového pufru (100mM Tris-HCl (pH 9,0); 150mM NaCl; 1mM MgCl₂) bylo pipetováno nejprve 33 µl NBT a poté 16,5 µl BCIP). Vyvolávání probíhalo přibližně 5 minut do objevení fialových proužků a bylo ukončeno promytím destilovanou vodou.

7. Výsledky a diskuze

Neuroblastom je nádorové onemocnění nervového systému, které se vyskytuje převážně u dětí. Asi 15 % všech dětských úmrtí v důsledku nádorového bujení je způsobeno právě neuroblastomem [47]. Klinicky pozitivní či negativní prognóza je úzce spjata s věkem pacienta - u dítěte mladšího 1,5 roku, kterému byl neuroblastom diagnostikován, je obvykle vyšší šance na uzdravení než u starších dětí [49].

Prognostickým markerem vývoje neuroblastomu je i amplifikace onkogenu MYCN a tudíž i zvýšená syntéza onkoproteinu N-myc. Jedním z faktorů stimulující expresi tohoto proteinu v neuroblastomových buňkách je inhibiční faktor migrace makrofágů (MIF), který je těmito buňkami produkován [5, 63]. MIF podporuje tvorbu nových cév stimulací produkce VEGF a samotná neovaskularizace je klíčovým procesem v tumorigenezi [22, 23]. Přírodním receptorem inhibičního faktoru migrace makrofágů je integrální membránový protein CD74 vyskytující se v membráně endoplasmatického retikula, Golgiho aparátu a v cytoplasmatické membráně buněk [37]. Přítomnost tohoto proteinu byla již detekována v jiných typech nádorů, např. v nádoru prsu či prostaty [40, 41]. Při vazbě MIF na extracelulární doménu CD74 dochází k aktivaci signální dráhy vedoucí k proliferaci buněk [37].

V této bakalářské práci bylo pomocí elektroforézy a následného přenosu proteinů na nitrocelulosoovou membránu studováno, zda je tento protein produkován i v lidských neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4.

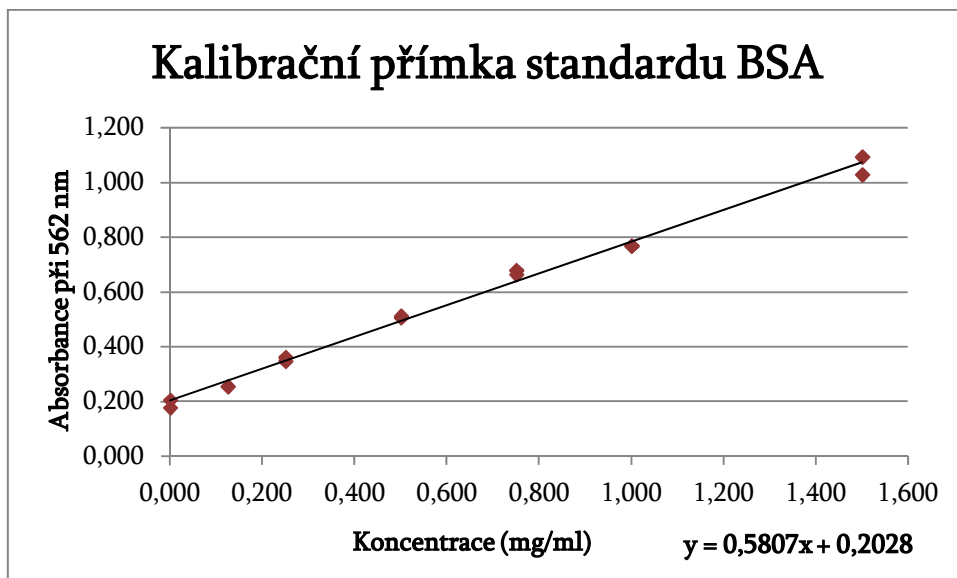
7.1. Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů v lyzátech neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3 a UKF-NB-4 bylo prováděno spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. K určení koncentrace proteinů bylo využito kalibrační přímky. Tato přímka byla získána měřením absorbance vzorků hovězího sérového albuminu (BSA) o známých koncentracích. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2. Kalibrační přímka standardu BSA je znázorněna na obrázku 7 na straně 37.

Tab. 2 - Absorbance standardu BSA o různých koncentracích při 562 nm.

První dva řádky tabulky označují absorbanci destilované vody (slepého vzorku).

c (mg/ml)	A_{562}
0,000	0,206
0,000	0,178
0,125	0,256
0,125	0,255
0,250	0,348
0,250	0,362
0,500	0,507
0,500	0,513
0,750	0,680
0,750	0,664
1,000	0,769
1,000	0,769
1,500	1,029
1,500	1,094



Obr. 7 - Kalibrační přímka standardu BSA. Na ose x je vynesena koncentrace jednotlivých dubletů BSA v mg/ml. Na ose y je vynesena absorbance měřená při 562 nm.

Koncentrace proteinů v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky byly získány prostřednictvím programu KIM 32. Hodnoty určené programem pomocí rovnice kalibrační přímky ($y = 0,5807x + 0,2028$) byly poté násobeny ředěním pro jednotlivé triplety, čímž byla zjištěna výsledná koncentrace proteinů v jednotlivých zkumavkách. Průměrné absorbance při 562 nm a průměrné výsledné koncentrace proteinů v jednotlivých tripletech jsou uvedeny v tabulce 3 na straně 38. Porovnáním absorbance jednotlivých jamek stejného ředění příslušného vzorku byla pro další práci volena koncentrace vycházející z ředění, jehož jednotlivé jamky měly absorbanci nejbližší.

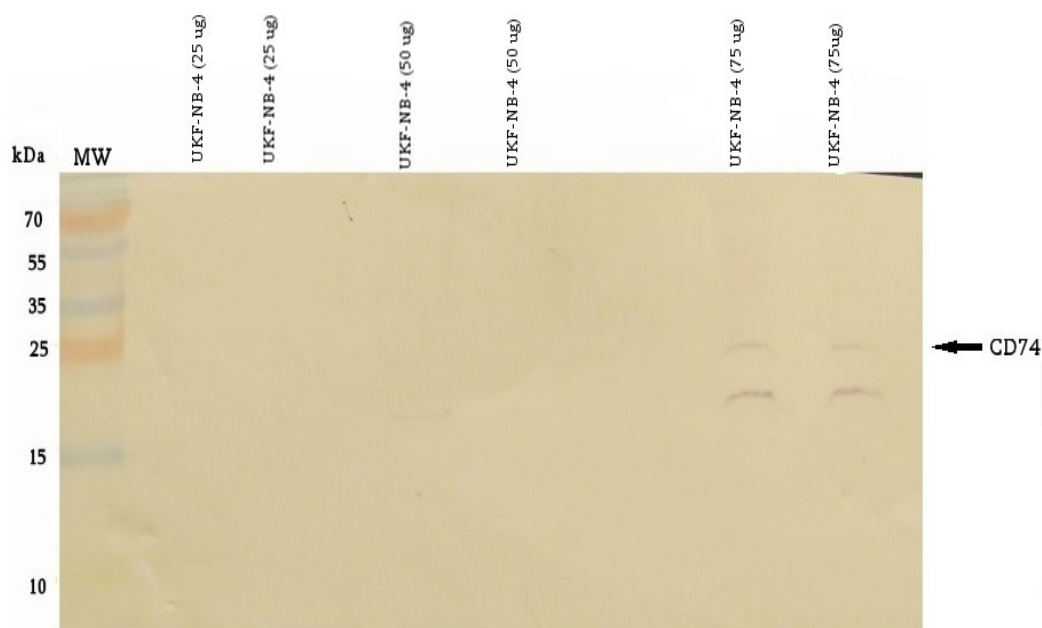
Tab. 3 - Zjištěné koncentrace proteinů v lyzátech buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. A_{562} značí průměrnou absorbanci tripletu vzorku při vlnové délce 562 nm, c_p označuje finální průměrnou koncentraci ve vzorku. Růžová políčka označují přesnější koncentraci dle absorbance jamek daného ředění.

UKF-NB-3			UKF-NB-4		
Vzorek	A_{562}	c_p (mg/ml)	Vzorek	A_{562}	c_p (mg/ml)
1 (20x)	0,282	9,584	1 (20x)	0,276	9,380
1 (50x)	0,164	13,905	1 (50x)	0,141	11,950
2 (20x)	0,301	10,242	2 (20x)	0,508	17,266
2 (50x)	0,180	15,295	2 (50x)	0,265	22,515
3 (20x)	0,295	10,038	3 (20x)	0,357	12,144
3 (50x)	0,147	12,520	3 (50x)	0,202	17,135

7.2 Imunodetekce proteinů

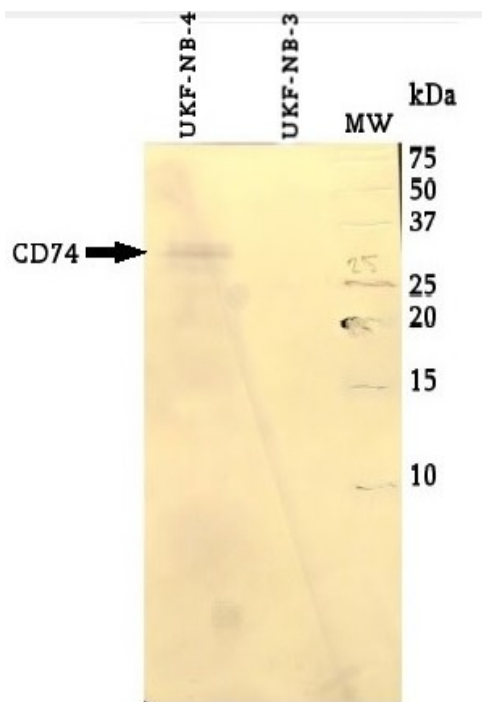
Proteiny získané izolací z neuroblastomových buněčných linií byly elektroforeticky rozděleny a následně přeneseny na nitrocelulosovou membránu metodou „Western blot“, kde byl detekován protein CD74 o molekulové hmotnosti 33 kDa. Pro identifikaci proteinu dle velikosti byl, vzhledem k nedostatku standardu molekulových hmotností od firmy Thermo Scientific, použit i standard molekulových hmotností od firmy BioRad.

U linie UKF-NB-4 byl protein CD74 detekován již při použití primární protilátky Anti-CD74 ředěné v poměru 1:1000. V tomto případě byly vzorky proteinů z linie UKF-NB-4 aplikovány v dubletech, které obsahovaly koncentraci proteinů pohybující se v rozmezí od 25 μ g/jamka do 75 μ g/jamka. Jak je patrné z obrázku 8 na straně 39, přítomnost proteinu CD74 byla jasně zřetelná až při koncentraci 75 μ g/jamka. Při provádění následujících experimentů byly na gel nanášeny proteiny pouze v koncentraci 75 μ g/jamka.

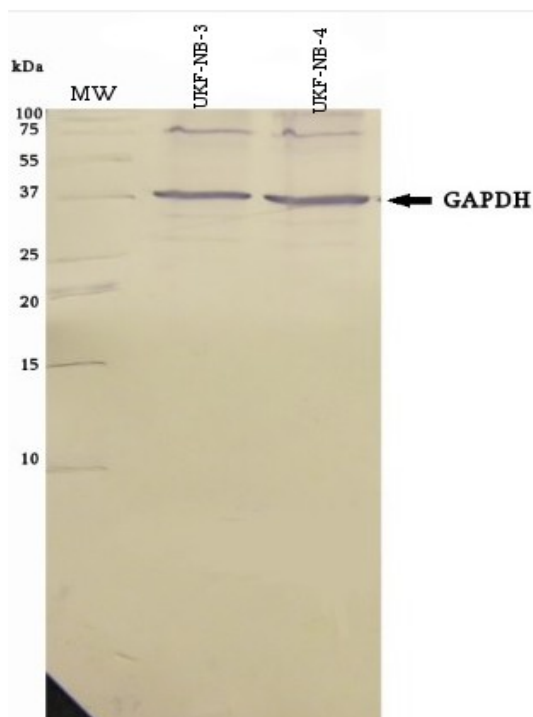


Obr. 8 - Detekce CD74 v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4. Protilátka Anti-CD74 byla ředěna v poměru 1:1000. Standard molekulových hmotností (od firmy Thermo Scientific) je v obrázku označen jako MW.

Ředění primární protilátky 1:1000 nebylo ovšem pro detekci CD74 v linii UKF-NB-3 dostatečné, proto bylo použito ředění 1:500 a 1:250. Protein CD74 se však v buněčné linii UKF-NB-3 ani v jednom případě ředění nepodařilo detekovat, byl pouze výrazněji označen v linii UKF-NB-4 (obrázek 9 na straně 40). Pro kontrolu dostatečného množství proteinů aplikovaného na gel (75 µg/jamka) byla jako kontrolní protein detekována glycerinaldehydfosfát dehydrogenasa (GAPDH; obrázek 10 na straně 40).



Obr. 9 - Imunodetekce CD74 v lidských neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. CD74 je zřetelný pouze v linii UKF-NB-4. Protilátka Anti-CD74 byla ředěna v poměru 1:250. Standard molekulových hmotností (od firmy BioRad), je označen MW.



Obr. 10 - Detekce GAPDH v neuroblastomových liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Kontrolní membrána. Standard molekulových hmotností (v obrázku označen jako MW) byl od firmy BioRad.

Z obrázku 8 na straně 39 a obrázku 9 na straně 40 je patrné, že přítomnost receptoru CD74 byla prokázána pouze v jedné z obou studovaných lidských neuroblastomových buněčných linií, v linii UKF-NB-4. Ve druhé studované linii, UKF-NB-3, se přítomnost receptoru CD74 metodou „Western blot“ detekovat nepodařilo.

Detekce proteinu CD74 pouze v jedné z obou studovaných linií může být dána typem těchto buněk. Lidské neuroblastomové buněčné linie je možné rozdělit do tří skupin podle buněčného fenotypu - N, S a I. Linie UKF-NB-3 se řadí mezi buňky typu N („neuroblastic“ neuroendokrinní prekurzor). Tyto buňky lépe adherují mezi sebou než k substrátu a často vytvářejí agregáty. Linie UKF-NB-4 se řadí mezi buňky typu S („Schwannian“ melanoblastický prekurzor), které snadněji adherují k substrátu a často tvoří jednovrstevné kultury. Třetím typem lidských neuroblastomových buněk je typ I („Intermediate“), který vykazuje fenotypové znaky obou předchozích typů [64]. V lidských neuroblastomových buněčných liniích typu S a I byla popsána přítomnost povrchového glykoproteinu CD44 [65]. Tento protein byl zároveň zjištěn i na povrchu T-lymfocytů, kde tvoří komplex s receptorem CD74. Na komplex CD74-CD44 se váže inhibiční faktor migrace makrofágů a umožňuje tak spuštění signalizační kaskády vedoucí k proliferaci buňky [33, 38]. Přítomnost CD74 v lidské neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 (S-typ) v souvislosti s popsanou produkcí CD44 v neuroblastomových buňkách S-typu tak naznačuje, že tyto buňky mohou být ovlivňovány MIF právě prostřednictvím komplexu CD74-CD44.

V různých koncentracích byl receptor CD74 zjištěn již dřívějšími studiemi ve spinocelulárním karcinomu hlavy a krku (zde byla popsána zvýšená exprese

tohoto proteinu), kde byla zároveň detekována také významně zvýšená koncentrace proteinu MIF [66] nebo v prostatických nádorových buňkách (v tomto případě byl CD74 detekován pouze slabým imunodetekčním značením a jeho koncentrace se výrazně nelišila od koncentrace CD74 v normálních prostatických buňkách) [67].

Díky přítomnosti receptoru CD74 mohou být i neuroblastomové buněčné linie ovlivňovány inhibičním faktorem migrace makrofágů. MIF je schopen pozitivně regulovat proliferaci buněk indukcí fosforylace ERK kinas, která je součástí signalizační dráhy Ras - Raf - MAPK - ERK, která se uplatňuje v buněčné proliferaci [68, 69]. ERK signalizační kaskáda podporuje produkci onkoproteinu N-myc, který také ovlivňuje proliferaci buněk [70, 71]. Pokud by byla exprese proteinu MIF v neuroblastomových buňkách potlačena, mohlo by dojít ke snížení proliferace buněk, jak bylo již popsáno u nádorových buněk slinivky břišní [72] a také ke snížení produkce N-myc. Je tedy zřejmé, že MIF může být pro neuroblastomové buňky velmi významný. Také je velmi důležitý v rámci celého nádoru, neboť je schopen stimulovat tvorbu nových cév, což je pro růst nádoru a jeho metastázování nezbytné [24].

8. Závěr

Využitím SDS elektroforézy a přenosu proteinů na nitrocelulosoovou membránu byl protein CD74 detekován v lidské neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 (S-typ). V lidské neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-3 (N-typ) nebyl CD74 metodou „Western blot“ potvrzen. Přítomnost tohoto proteinu, byť pouze v jedné ze studovaných linií indikuje, že i neuroblastomy mohou být ovlivňovány inhibičním faktorem migrace makrofágů prostřednictvím CD74.

Seznam použité literatury

- [1] “Nádorová onemocnění,” 3.8.2015. [Online]. Available: <http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni>.
- [2] “Projekt adresného zvaní na preventivní screeningová vyšetření,” 3.8.2015. [Online]. Available: http://www.mzcr.cz/obsah/projekt-adresneho-zvani-na-preventivni-screeningova-vysetreni_3024_1.html.
- [3] “Nejčastější nádorová onemocnění dětí,” 3.8.2015. [Online]. Available: <http://kdho.lf2.cuni.cz/klinika/?page=3>.
- [4] “Neuroblastom,” 3.8.2015. [Online]. Available: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/pokroky-v-diagnostice-a-lecbe-neuroblastomu-u-deti-162702>.
- [5] Q. Bin, B. D. Johnson, D. W. Schauer, J. T. Casper, and R. J. Orentas, “Production of macrophage migration inhibitory factor by human and murine neuroblastoma,” *Tumor Biol.*, vol. 23, no. 3, pp. 123–129, 2002.
- [6] Y. Ren, H. M. Chan, J. Fan, Y. Xie, Y. X. Chen, W. Li, G. P. Jiang, Q. Liu, A. Meinhardt, and P. K. H. Tam, “Inhibition of tumor growth and metastasis in vitro and in vivo by targeting macrophage migration inhibitory factor in human neuroblastoma,” *Oncogene*, vol. 25, no. 25, pp. 3501–3508, 2006.
- [7] J. R. David, “Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 56, no. 1, pp. 72–77, 1966.
- [8] B. R. Bloom and B. Bennett, “Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity,” *Science (80-)*, vol. 153, no. 3731, pp. 80–82, 1966.
- [9] T. Calandra, J. Bernhagen, R. A. Mitchell, and R. Bucala, “The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor,” *J. Exp. Med.*, vol. 179, no. 6, pp. 1895–1902, 1994.
- [10] Q. Zhou, X. Yan, J. Gershan, R. J. Orentas, and B. D. Johnson, “Expression of macrophage migration inhibitory factor by neuroblastoma leads to the inhibition of antitumor T cell reactivity in vivo,” *J. Immunol.*, vol. 181, no. 3, pp. 1877–1886, 2008.
- [11] W. Y. Weiser, P. A. Temple, J. S. Witek-Giannotti, H. G. Remold, S. C. Clark, and J. R. David, “Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 19, pp. 7522–7526, 1989.

- [12] H. W. Sun, J. Bernhagen, R. Bucala, and E. Lolis, "Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 93, no. 11, pp. 5191–5196, 1996.
- [13] H.-W. Sun, M. Swope, C. Craig, S. Bedarkar, J. Bernhagen, R. Bucala, and E. Lolis, "The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 9, no. 8, pp. 631–635, 1996.
- [14] L. H. Block, H. Jaksche, S. Bamberger, and G. Ruhenstroth-Bauer, "Human migration inhibitory factor: purification and immunochemical characterization," *J. Exp. Med.*, vol. 147, no. 2, pp. 541–553, 1978.
- [15] R. Donn and D. W. Ray, "Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule," *J. Endocrinol.*, vol. 182, no. 1, pp. 1–9, 2004.
- [16] M. Bacher, C. N. Metz, T. Calandra, K. Mayer, J. Chesney, M. Lohoff, D. Gemsa, T. Donnelly, and R. Bucala, "An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 15, pp. 7849–7854, 1996.
- [17] J. A. Baugh and S. C. Donnelly, "Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation," *J. Endocrinol.*, vol. 179, no. 1, pp. 15–23, 2003.
- [18] T. Calandra, J. Bernhagen, C. N. Metz, L. A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami, and R. Bucala, "MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production," *Nature*, vol. 377, no. 6544, pp. 68–71, 1995.
- [19] T. Calandra and T. Roger, "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 10, pp. 791–800, 2003.
- [20] E. Rosengren, P. Åman, S. Thelin, C. Hansson, S. Ahlfors, P. Björk, L. Jacobsson, and H. Rorsman, "The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase," *FEBS Lett.*, vol. 417, no. issue 1, pp. 85–88, 1997.
- [21] N. Takahashi, J. Nishihira, Y. Sato, M. Kondo, H. Ogawa, T. Ohshima, Y. Une, and S. Todo, "Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth.," *Mol. Med.*, vol. 4, no. 11, pp. 707–714, 1998.
- [22] C. Munaut, J. Boniver, J.-M. Foidart, and M. Deprez, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in human glioblastomas correlates with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression," *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 28, no. 6, pp. 452–460, 2002.

- [23] M. A. Gimbrone, S. B. Leapman, R. S. Cotran, and J. Folkman, "Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization," *J. Exp. Med.*, vol. 136, no. 2, pp. 261–276, 1972.
- [24] J. Chesney, C. Metz, M. Bacher, T. Peng, A. Meinhardt, and R. Bucala, "An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma," *Mol. Med.*, vol. 5, no. 3, pp. 181–191, 1999.
- [25] X. Yan, R. Orentas, and B. D. Johnson, "Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibits T lymphocyte activation," *Cytokine*, vol. 33, no. 4, pp. 188–198, 2006.
- [26] L. Claesson, D. Larhammar, L. Rask, and P. A. Peterson, "cDNA clone for the human invariant gamma chain of class II histocompatibility antigens and its implications for the protein structure.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 80, no. 24, pp. 7395–7399, 1983.
- [27] P. Stumptner-Cuvelette and P. Benaroch, "Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1542, no. 1–3, pp. 1–13, 2002.
- [28] D. Starlets, Y. Gore, I. Binsky, M. Haran, N. Harpaz, L. Shvidel, S. Becker-Herman, A. Berrebi, and I. Shachar, "Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival," *Blood*, vol. 107, no. 12, pp. 4807–4816, 2006.
- [29] M. Strubin, C. Berte, and B. Mach, "Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain.," *EMBO J.*, vol. 5, no. 13, pp. 3483–3488, 1986.
- [30] V. Lotteau, L. Teyton, A. Peleraux, T. Nilsson, L. Karlsson, S. L. Schmid, V. Quaranta, and P. A. Peterson, "Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain," *Nature*, vol. 348, no. 6302, pp. 600–605, 1990.
- [31] M. P. Schutze, P. A. Peterson, and M. R. Jackson, "An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum," *EMBO J.*, vol. 13, no. 7, pp. 1696–1705, 1994.
- [32] C. J. Wraight, P. van Endert, P. Möller, J. Lipp, R. N. Ling, I. C. M. MacLennan, N. Koch, and G. Moldenhauer, "Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 10, pp. 5787–5792, 1990.
- [33] K. Butterfield, C. G. Fathman, and R. C. Budd, "A subset of memory CD4+ helper T lymphocytes identified by expression of Pgp-1," *J. Exp. Med.*, vol. 169, no. 4, pp. 1461–1466, 1989.

- [34] M. F. Naujokas, M. Morin, M. S. Anderson, M. Peterson, and J. Miller, "The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44," *Cell*, vol. 74, no. 2, pp. 257–268, 1993.
- [35] I. Shachar and R. A. Flavell, "Requirement for Invariant Chain in B Cell Maturation and Function," *Science (80-.)*, vol. 274, no. 5284, pp. 106–108, 1996.
- [36] D. Matza, O. Wolstein, R. Dikstein, and I. Shachar, "Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAFII105-NF-kB-dependent transcription program," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 29, pp. 27203–27206, 2001.
- [37] L. Leng, C. N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R. A. Mitchell, and R. Bucala, "MIF signal transduction initiated by binding to CD74.," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 11, pp. 1467–76, 2003.
- [38] X. Shi, L. Leng, T. Wang, W. Wang, X. Du, J. Li, C. McDonald, Z. Chen, J. W. Murphy, E. Lolis, P. Noble, W. Knudson, and R. Bucala, "CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex.," *Immunity*, vol. 25, no. 4, pp. 595–606, 2006.
- [39] Y. Gore, D. Starlets, N. Maharshak, S. Becker-Herman, U. Kaneyuki, L. Leng, R. Bucala, and I. Shachar, "Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 5, pp. 2784–92, 2008.
- [40] V. Richard, N. Kindt, C. Decaestecker, H. J. Gabius, G. Laurent, J.-C. Noël, and S. Saussez, "Involvement of macrophage migration inhibitory factor and its receptor (CD74) in human breast cancer," *Oncol. Rep.*, vol. 32, no. 2, pp. 523–529, 2014.
- [41] K. L. Meyer-Siegler, K. A. Iczkowski, L. Leng, R. Bucala, and P. L. Vera, "Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 12, pp. 8730–8739, 2006.
- [42] M. McClelland, L. Zhao, S. Carskadon, and D. Arenberg, "Expression of CD74, the receptor for macrophage migration inhibitory factor, in non-small cell lung cancer," *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 2, pp. 638–646, 2009.
- [43] J.-F. Zhang, R. Hua, D.-J. Liu, W. Liu, Y.-M. Huo, and Y.-W. Sun, "Effect of CD74 on the prognosis of patients with resectable pancreatic cancer," *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, vol. 13, no. 1, pp. 81–86, 2014.
- [44] R. Stein, M. J. Mattes, T. M. Cardillo, H. J. Hansen, C.-H. Chang, J. Burton, S. Govindan, and D. M. Goldenberg, "CD74: A new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 18, p. 5556s–5563s, 2007.

- [45] H. Shimada, I. M. Ambros, L. P. Dehner, J. Hata, V. V Joshi, and B. Roald, "Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors," *Cancer*, vol. 86, no. 2, pp. 349–363, 1999.
- [46] J. M. Maris and K. . Matthay, "Molecular biology of neuroblastoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 17, no. 7, pp. 2264–2279, 1999.
- [47] G. M. Brodeur, "Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 3, pp. 203–216, 2003.
- [48] I. M. Ambros, J. Hata, V. V Joshi, B. Roald, L. P. Dehner, H. Tüchler, U. P. M.Sc., and H. Shimada, "Morphologic features of neuroblastoma (Schwannian stroma-poor tumors) in clinically favorable and unfavorable groups," *Cancer*, vol. 94, no. 5, pp. 1574–1583, 2002.
- [49] S. L. Cohn, A. D. J. Pearson, W. B. London, T. Monclair, P. F. Ambros, G. M. Brodeur, A. Faldum, B. Hero, T. Iehara, D. Machin, V. Mosseri, T. Simon, A. Garaventa, V. Castel, and K. K. Matthay, "The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System," *J. Clin. Oncol*, vol. 27, no. 2, pp. 289–297, 2009.
- [50] R. . Castleberry, J. Pritchard, P. Ambros, F. Berthold, G. . Brodeur, V. Castel, S. . Cohn, B. De Bernardi, C. Dicks-Mireaux, D. Frappaz, G. . Haase, M. Haber, D. . Jones, V. . Joshi, M. Kaneko, J. . Kemshead, P. Kogner, R. E. . Lee, K. . Matthay, J. . Michon, R. Monclair, B. . Roald, R. . Seeger, P. . Shaw, H. Shimada, and J. . Shuster, "The International Neuroblastoma Risk Groups (INRG): a preliminary report," *Eur. J. Cancer*, vol. 33, no. 12, pp. 2113–2116, 1997.
- [51] G. J. D'Angio, A. E. Evans, and C. E. Koop, "Special pattern of widespread neuroblastoma with favourable prognosis," *Lancet*, vol. 1, no. 7708, pp. 1046–1049, 1971.
- [52] A. E. Evans, G. J. D'Angio, and J. Randolph, "A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A," *Cancer*, vol. 27, no. 2, pp. 374–378, 1971.
- [53] T. Iehara, E. Hiyama, T. Tajiri, A. Yoneda, M. Hamazaki, M. Fukuzawa, H. Hosoi, T. Sugimoto, and T. Sawada, "Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12months of age and older really excellent?," *Eur. J. Cancer*, vol. 48, no. 11, pp. 1707–1712, 2012.
- [54] C. Laverdiere, Q. Liu, Y. Yasui, P. C. Nathan, J. G. Gurney, M. Stovall, L. R. Diller, N.-K. Cheung, S. Wolden, L. L. Robison, and C. A. Sklar, "Long-term outcomes in survivors of neuroblastoma: a report from the childhood cancer survivor study," *J. Natl. Cancer Inst*, vol. 101, no. 16, pp. 1131–1140, 2009.
- [55] K. K. Matthay, J. G. Villablanca, R. C. Seeger, D. O. Stram, R. E. Harris, N. K. Ramsay, P. Swift, H. Shimada, C. T. Black, G. M. Brodeur, R. B. Gerbing, and C. P. Reynolds,

- “Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13- cis -retinoic acid,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, no. 16, pp. 1165–1173, 1999.
- [56] G. Brodeur, R. Seeger, M. Schwab, H. Varmus, and J. Bishop, “Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage,” *Science (80-)*, vol. 224, no. 4653, pp. 1121–1124, 1984.
- [57] D. Slamon, T. Boone, R. Seeger, D. Keith, V. Chazin, H. Lee, and L. M. Souza, “Identification and characterization of the protein encoded by the human N-myc oncogene,” *Science (80-)*, vol. 232, no. 4751, pp. 768–772, 1986.
- [58] A. Wenzel, C. Cziepluch, U. Hamann, J. Schümann, and M. Schwab, “The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells,” *EMBO J*, vol. 10, no. 12, pp. 3703–3712, 1991.
- [59] L. Chen, N. Iraci, S. Gherardi, L. D. Gamble, K. M. Wood, G. Perini, J. Lunec, and D. A. Tweddle, “p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma,” *Cancer Res.*, vol. 70, no. 4, pp. 1377–1388, 2010.
- [60] A. J. Levine, “p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division,” *Cell*, vol. 88, no. 3, pp. 323–331, 1997.
- [61] M. Hollstein, K. Rice, M. S. Greenblatt, T. Soussi, R. Fuchs, T. Sørlie, E. Hovig, B. Smith-Sørensen, R. Montesano, and C. C. Harris, “Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines,” *Nucleic Acids Res*, vol. 22, no. 17, pp. 3551–3555, 1994.
- [62] K. Vogan, M. Bernstein, J. Leclere, L. Brisson, J. Brossard, G. M. Brodeur, J. Pelletier, and P. Gros, “Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas,” *Cancer Res.*, vol. 53, no. 21, pp. 5269–5273, 1993.
- [63] Y. Ren, H. M. Chan, Z. Li, C. Lin, J. Nicholls, C. F. Chen, P. Y. Lee, V. Lui, M. Bacher, and P. K. H. Tam, “Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced N-Myc expression by the activation of ERK signaling pathway and increased expression of interleukin-8 and VEGF in neuroblastoma,” *Oncogene*, vol. 23, no. 23, pp. 4146–4154, 2004.
- [64] R. A. Ross, J. L. Biedler, and B. A. Spengler, “A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors,” *Cancer Lett.*, vol. 197, no. 1–2, pp. 35–39, 2003.
- [65] N. Gross, C. Beretta, G. Peruisseau, D. Jackson, D. Simmons, and D. Beck, “CD44H expression by human neuroblastoma cells,” *Cancer Res.*, vol. 54, no. 15, pp. 4238–4242, 1994.

- [66] N. Kindt, J. R. Lechien, D. Nonclercq, G. Laurent, and S. Saussez, "Involvement of CD74 in head and neck squamous cell carcinomas," *J. Cancer Res. Clin. Oncol*, vol. 140, no. 6, pp. 937–947, 2014.
- [67] K. L. Meyer-Siegler, K. A. Iczkowski, and P. L. Vera, "Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer," *BMC Cancer*, vol. 5, no. 1, p. 73–, 2005.
- [68] R. A. Mitchell, C. N. Metz, T. Peng, and R. Bucala, "Sustained Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 25, pp. 18100–18106, 1999.
- [69] D. T. Denhardt, "Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling.," *Biochem. J.*, vol. 318, no. 3, pp. 729–747, 1996.
- [70] J.-P. Bach, O. Deuster, M. Balzer-Geldsetzer, B. Meyer, R. Dodel, and M. Bacher, "The role of macrophage inhibitory factor in tumorigenesis and central nervous system tumors," *Cancer*, vol. 115, no. 10, pp. 2031–2040, 2009.
- [71] D. Chambéry, S. Mohseni-Zadeh, B. de Gallé, and S. Babajko, "N-myc regulation of type I insulin-like growth factor receptor in a human neuroblastoma cell line," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 12, pp. 2898–2902, 1999.
- [72] A. Denz, C. Pilarsky, D. Muth, F. Rückert, H.-D. Saeger, and R. Grützmann, "Inhibition of MIF Leads to Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells," *J. Surg. Res.*, vol. 160, no. 1, pp. 29–34, 2010.
- [73] "MIF," 12.7.2015. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_migration_inhibitory_factor#/media/File:PD B_1mif_EBI.jpg.
- [74] "Funkce MIF," 15.7.2015. [Online]. Available: http://www.nature.com/nm/journal/v9/n5/fig_tab/nm0503-517_F4.html. [Accessed: 15-Jul-2015].
- [75] "CD74 molecule," 15.7.2015. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/CD74#/media/File:Protein_CD74_PDB_1icf.png.
- [76] "Hoefer SE300 miniVE," 18.4.2015. [Online]. Available: <http://www.hoeferinc.com/index.php/literature/user-manuals/>.

