

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

**Charles University, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Doktorský studijní program: Biochemie
Doctoral study programme: Biochemistry

*Autoreferát disertační práce
Summary of the Doctoral thesis*



**Studium mechanismů účinku protinádorových léčiv na neuroblastomy
Study of the mechanism of anticancer drug action on neuroblastomas**

Mgr. Tereza Černá

Školitel/Supervisor: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Školitel-konzultant/Supervisor-consultant: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha, 2018

Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou i přes veškeré pokroky v onkologické diagnostice a terapii druhou nejčastější příčinou úmrtnosti. Proto je naší snahou přispět ke zlepšení této situace. Cílem disertační práce bylo studium vlivu dvou protinádorových léčiv elliptycinu (Elli) a doxorubicinu (DOX) na vybrané nádorové i zdravé buněčné linie. Zvláštní zřetel byl kladen na rozšíření současných znalostí o metabolismu a cytostatických účincích Elli v neuroblastomových buněčných liniích. Jednalo se také o objasnění mechanismu vzniku resistance nádorových buněk vůči Elli a vysvětlení, jaký vliv na protinádorovou léčbu mohou vykazovat inhibitory histondeacetylas. V neposlední řadě bylo cílem vyvinout apoferritinový (Apo) nanotransportér, který by byl vhodný pro transport cytostatik do nádorových buněk. V disertační práci bylo zjištěno několik zásadních poznatků. Cytochrom P450 (CYP) 3A4 oxiduje Elli na metabolity, jež tvoří dva kovalentní adukty s DNA. Tvorba aduktů byla pozorována také v případě, kdy byl CYP3A4 enkapsulován do nanočásticového systému, konkrétně systémů liposomů či SupersomůTM. Množství aduktů bylo závislé na koncentraci enkapsulovaného CYP3A4. SupersomálníTM CYP3A4, ve srovnání s liposomálním CYP3A4, generuje větší množství aduktů s DNA díky přítomnosti určitých typů lipidů a proteinů nebo cytochromu b₅. Nanočásticové formy CYP3A4 mohou být účinné pro přenos enzymu do nádorové tkáně, kde mohou efektivně aktivovat ellipticin. Zjistili jsme, že jedním z mechanismů, které přispívají ke vzniku resistance neuroblastomových buněk vůči Elli je sekvestrace cytostatika v lysosomech těchto buněk. Elli je tak přítomný v jádrech a cytoplasmě buněk v nízkých koncentracích a jeho cytotoxické účinky jsou sníženy. Sekvestrace je závislá na expresi vakuolární (V)-ATPasy. Inhibitory V-ATPasy snižují vakuolizaci Elli v lysosomech, a tím zvyšují jeho cytostatické účinky v nádorových buňkách. Při studiu vlivu inhibitoru histondeacetylas valproátu (VPA), s cílem potencovat cytotoxické účinky Elli v neuroblastomových buněčných liniích, jsme zjistili synergistický účinek obou léčiv. Jejich synergický účinek byl patrný pouze při současném podání obou léků nebo v případě působení nejprve samotného Elli následovaného VPA. VPA zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4, která je důležitá pro zpřístupnění DNA metabolitům elliptycinu, vedoucímu k tvorbě kovalentních aduktů s DNA, které jsou hlavním mechanismem účinku tohoto léčiva. Jako jeden z přístupů, jak redukovat nežádoucí účinky cytostatik, bylo studium použití nanočástic Apo pro cílený transport cytostatik. Apo je selektivně rozpoznán membránovými receptory SCARA5 a TfR1, jež jsou exprimovány mnoha nádorovými buňkami. Elli enkapsulací neztratí svou cytotoxickou aktivitu. Zároveň je schopen vstupovat do jader

neuroblastomových buněk, kde poškozuje DNA. Naopak v nenádorových fibroblastech je Elli uvolněný z Apo sekvestrován v lysosomech a jeho cytotoxické účinky jsou tak výrazně sníženy. Povrch Apo lze navíc konjugovat protilátkami proti specifickým antigenům exprimovaným na povrchu nádorových buněk. Proto byl v práci navržen, připraven a charakterisován nanotransportér (s enkapsulovaným DOX), který byl selektivně cílený protilátkou proti specifickému prostatickému membránovému antigenu, jež je exprimován prostatickými nádorovými buňkami. Připravený nanotransportér specificky „cílí“ na testované nádorové buňky. Navíc, modifikace jeho povrchu protilátkou snížila toxické účinky DOX ve zdravých buňkách.

Klíčová slova: apoferritin, chemoresistence, cytochromy P450, doxorubicin, ellipticin, inhibitory histondeacetylas, nádorové buněčné linie, nádor prostaty, nanočástice, neuroblastom

Abstract

Despite advances in cancer diagnosis and therapy, cancer is the second leading cause of death globally. The improvements of cancer treatment are the major challenge in this research. The aim of the thesis was studying of effects of two anticancer drugs ellipticine (Elli) and doxorubicin (DOX) on some cancer and healthy cell lines. Specific consideration was given to expand current knowledge about the metabolism and cytostatic effects of Elli in neuroblastoma cell lines. Another part of this study was focused on mechanisms contributing to the development of ellipticine-resistance in cancer cells and influence of histone deacetylase inhibitors on anticancer therapy was investigated. Moreover, the aim was to develop apoferritin (Apo) nanocarrier suitable for the active transport of cytostatics to cancer cells. Several essential data were found in this doctoral thesis. Anticancer efficiency of Elli depends on the CYP3A4-mediated metabolism in cancer. The CYP3A4 enzyme encapsulated into two nanoparticle forms, liposomes and SupersomesTM, was tested to activate ellipticine to its reactive species forming covalent DNA adducts. The formation of adducts seems to be dependent on concentrations of CYP3A4 in nanoparticle systems. A higher effectiveness of CYP3A4 in SupersomesTM than in liposomes to form ellipticine-DNA adducts was caused by the presence of all spectrum of membrane-making lipids, proteins and cytochrome b₅. Nanoparticle forms of CYP3A4 seem to be suitable for delivery of the enzyme to cancer cells. The results found in this study demonstrate that sequestration of Elli into lysosomes of neuroblastoma cells is one of the mechanisms contributing to the development of Elli-resistance in these cells. This sequestration resulted in lower cytoplasmic concentrations of Elli and less nuclear accumulation and therefore also lower toxic effects to these cells. We demonstrated that this resistance is dependent on upregulation of the vacuolar (V)-ATPase. Pretreatment with V-ATPase inhibitors decreased sequestration of Elli in lysosomes and enhanced the cytotoxicity of this anticancer drug. The influence of histone deacetylase inhibitor valproate (VPA) combined with Elli on neuroblastoma cells was investigated. The synergism of their efficacy was detected only after either simultaneous exposure to these drugs or after pretreatment of cells with Elli before VPA. VPA increases the acetylation of histones H3 and H4 that is important to improve binding of Elli to DNA leading to the formation of covalent adducts with DNA which is the most important mechanism of anticancer effect of Elli. One of the approaches to decrease the adverse effects of drugs is their encapsulation inside a suitable nanocarrier, Apo, allowing for a targeted delivery to tumor tissue whereas avoiding healthy cells. Apo is selectively recognized by membrane

receptors SCARA5 and TfR1, highly expressed in many cancer cells. Elli either free or released from Apo was concentrated in the nuclei of neuroblastoma cells. In fibroblasts the higher amounts of Elli were sequestered in lysosomes that resulted in the lower cytotoxic effect of cytostatic. In addition, to enhance the nanoparticle specificity, targeting antibodies can be bind to Apo. Herein, we describe a novel approach for targeting of Apo (encapsulating DOX) to prostate cancer using antibodies against prostate specific membrane antigen that is overexpressed in prostate cancer cells. Prepared nanocarrier specifically targeted cancer cells. Modification of its surface reduced toxic effects of DOX in healthy cells.

Key words: apoferritin, chemoresistance, cytochromes P450, doxorubicin, ellipticine, histone deacetylase inhibitors, cancer cell lines, prostate cancer, nanoparticles, neuroblastoma

(In Czech)

1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY

1.1. Karcinogeneze a znaky nádorových buněk

Nádorová onemocnění jsou jedním z hlavních problémů veřejného zdraví na celém světě a druhou nejčastější příčinou úmrtnosti. Každý rok je v České republice nově diagnostikováno kolem 80 tisíc pacientů se zhoubným novotvarem a ročně na ně umírá 30 tisíc osob (www.linkos.cz; www.szu.cz, www.svod.cz).

Nádorové onemocnění je způsobeno kombinací genetických faktorů a faktorů okolního prostředí (chemických, fyzikálních a biologických). Vícestupňový proces karcinogeneze, při kterém nádor vzniká a vyvíjí se, je výsledkem interakce genetických a epigenetických změn ve zdravé buňce, která se postupně mění na buňku nádorovou. Proces karcinogeneze lze rozdělit do tří fází – iniciační, promoční a progresní (Pitot, 1993).

Charakteristickými znaky nádorových buněk je neomezený replikační potenciál, nezávislost na růstových faktorech, necitlivost vůči antiapoptotickým signálům, resistance vůči apoptose, zvýšený anaerobní metabolismus, zvýšená angiogeneze, tkáňová invazivita a metastasování (Hanahan a Weinberg, 2011).

1.2. Chemoterapie

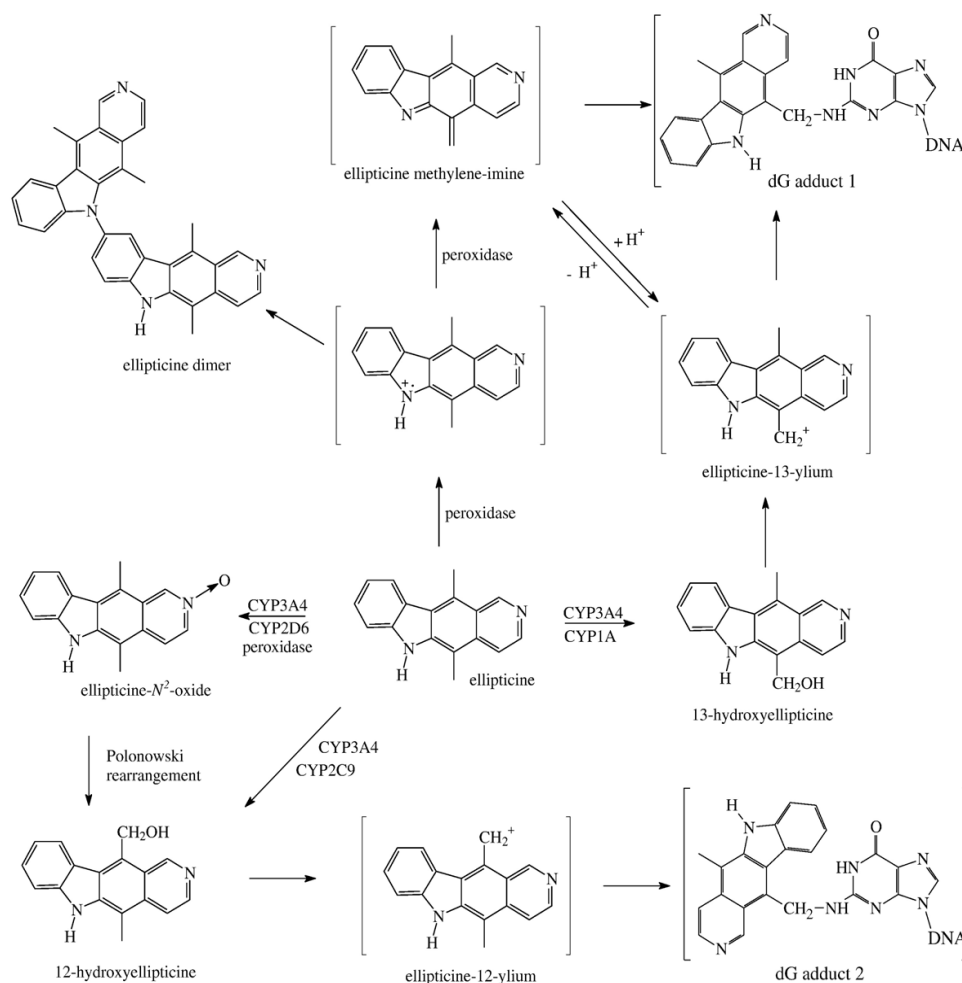
Chemoterapie je protinádorová léčba využívající terapeutických účinků chemických látek toxických pro buňky – cytostatik. Jedná se o systémovou léčbu, kdy chemoterapeutika obvykle zasahují do buněčného cyklu a/nebo metabolických procesů nádorových buněk, a tím brání buňkám v dalším dělení. Cytostatika působí neselektivně. Na léčbu jsou citlivější rychle se dělící buňky, což zahrnuje jen buňky nádorové, ale též buňky fyziologicky se vyznačující rychlým dělením a vysokou incidencí mitos (Klener, 2011).

1.2.1. Ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol) je rostlinný alkaloid vykazující vysokou protinádorovou aktivitu a relativně nízké vedlejší toxické účinky (Stiborová *et al.*, 2003; DeMarini, 1983). Přesný mechanismus, jakým ellipticin navozuje apoptosu, není znám. Předpokládá se, že působí kombinovaným mechanismem způsobujícím zástavu buněčného cyklu založeným na:

- 1) interkalaci do dvoušroubovicové struktury DNA, která vyplývá z tvaru a velikosti molekuly ellipticinu (Stiborová *et al.*, 2004, Stiborová *et al.*, 2006),
- 2) inhibici topoisomerasy II, která vede k tvorbě dvouvláknových zlomů DNA (Froelich-Ammon *et al.*, 1995),
- 3) inhibici fosforylace proteinu p53, kdy nahromadění defosforylovaného p53 může indukovat apoptosu (Ohashi *et al.*, 1995),
- 4) inhibici oxidační fosforylace, kdy ellipticin snižuje množství ATP v mitochondriích a narušuje tak energetickou rovnováhu buňky (Schwaller *et al.*, 1995),
- 5) inhibici telomeras (Auclair, 1989),
- 6) tvorbě aduktů s DNA, kdy je ellipticin v průběhu metabolismu aktivován na metabolity, které se kovalentně vážou na DNA, ellipticin tedy může působit jako alkylační činidlo (Stiborová *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 2003; Stiborová *et al.*, 2004).

Ellipticin je v organismu biotransformován cytochromy P450 (CYP) na 5 hydroxylovaných metabolitů - 7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu (Stiborová *et al.*, 2004) (Obr. 1). Z lidských CYP se na detoxikaci ellipticinu podílí zejména 1A1, 1A2, 1B1 a na aktivaci pak 3A4, 2C9, 2D6 a 1A2 (Stiborová *et al.*, 2003; Stiborová *et al.*, 2006). Detoxikační metabolity ellipticinu (7-hydroxyellipticin a 9-hydroxyellipticin) vstupují do II. fáze biotransformace a jsou z těla vylučovány, zatímco aktivační metabolity (12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu) jsou zodpovědné zejména za tvorbu kovalentních aduktů s DNA (Stiborová *et al.*, 2007).



Obr. 1: Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 a peroxidasami na metabolity ellipticinu, které tvoří adukty s DNA. Sloučeniny v závorkách nebyly dosud experimentálně prokázány (převzato ze Stiborová *et al.*, 2008).

1.2.2. Doxorubicin

Ačkoli je antracyklinové antibiotikum doxorubicin rozsáhle klinicky využíváno, přesný mechanismus jeho protinádorového účinku není znám. Předpokládá se, že klíčové budou účinky doxorubicinu založené na:

- 1) interkalaci do DNA vedoucí k inhibici syntesy DNA, RNA a proteinů (Gewirtz, 1999);
- 2) tvorbě volných radikálů a reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují poškození DNA nebo peroxidaci lipidů, předpokládá se, že tvorba ROS je odpovědná za kardiotoxicitu antracyklinů (Marnett *et al.*, 2003);
- 3) vazbě na DNA a její alkylationi (Minotti *et al.*, 2004);
- 4) „cross-linkingu“ DNA (Gewirtz, 1999);

- 5) inhibici topoisomerasy II vedoucí k tvorbě dvouvláknových zlomů DNA a indukci apoptosy (Binachi *et al.*, 1997; Binachi *et al.* 2000).

1.2.3. Inhibitory histondeacetylas v léčbě nádorových onemocnění

Inhibitory histondeacetylas (HDAC) jsou dobře tolerovány a klinicky účinné proti hematologickým malignitám, ale nejsou účinné u solidních nádorů, pokud jsou použity samostatně (Duvic *et al.*, 2007; Modesitt *et al.*, 2008; Luu *et al.*, 2008). Vykazují však aditivní nebo synergické protinádorové účinky v kombinaci s chemoterapeutiky, cílenými léky a radiační léčbou (Rosato a Grant, 2004; Bhalla, 2005; Marks a Dokmanovic, 2005; Bolden *et al.*, 2006).

Kyselina valproová (VPA) se používá především při léčbě epilepsie, migrény, bipolární poruchy a dalších psychiatrických poruch (Chateauvieux *et al.*, 2010). V posledních letech je testována v klinických studiích jako protinádorový lék, protože působí jako inhibitor HDAC (Terbach a Williams, 2009). Mechanismus účinku valproátu na nádorové buňky není zcela objasněn. VPA působí jako inhibitor HDAC třídy I a II (Gottlicher *et al.*, 2001; Phiel *et al.*, 2001), aktivuje proteasomální degradaci, inhibuje protein-kinasu C (Blaheta *et al.*, 2002), demethyluje DNA a má antiangiogenní účinky (Michaelis *et al.*, 2004). Důležitým mechanismem protinádorového účinku VPA je pravděpodobně hyperacetylace histonu H3 a H4 a dalších „nehistonových“ proteinů v důsledku inhibice HDAC (Phiel *et al.*, 2001). Kyselina valproová je v posledních letech zkoumána zejména kvůli jejímu potenciálu v protinádorové léčbě kombinované s cytostatiky.

1.2.4. Nanotransportéry jako nosiče protinádorových léčiv

Nanotransportéry jsou submikronové částice (obvykle < 500 nm) (Neubert, 2011), které mají vzhledem k jejich velkému poměru povrchu k objemu schopnost měnit vlastnosti a bioaktivitu léčiv. Jejich použití při protinádorové léčbě může významně zlepšit farmakologické a farmakokinetické vlastnosti cytostatik, zlepšit jejich biodistribuci, zvýšit stabilitu a rozpustnost léčiva, a snížit tak toxické nežádoucí účinky. Navíc mohou nanotransportéry nést současně i více látek (Mishra *et al.*, 2010).

Apoferritin (Apo) se řadí do skupiny proteinových (peptidových) nanočástic. Apo se přirozeně vyskytuje jako proteinová složka ferritinu, která tvoří „klec“ kolem iontů železa. Tento intracelulární protein se skládá z 24 podjednotek s dutinou o průměru 8 nm. Vnitřní prostor je vhodný pro enkapsulaci protinádorových léčiv. Výhodou apoferritinového

nanotransportéru je jeho internalisace do buněk prostřednictvím transferrinového receptoru TfR1 nebo receptoru SCARA5 (z angl. „*scavenger receptor class A member 5*“), které jsou nadměrně exprimovány některými nádorovými buňkami. Navíc tento přirozeně se vyskytující protein nevyvolává žádnou imunitní odpověď organismu a jeho povrch může být dále modifikován ligandy (Gallois *et al.*, 1997; Kilic *et al.*, 2012; Blazkova *et al.*, 2013; Mendes-Jorge *et al.*, 2014).

2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

I přes veškerý pokrok v nádorové diagnostice a terapii je léčba nádorových onemocnění obtížná a terapeutické přístupy jsou často nedostačující. Cílem předkládané disertační práce bylo proto studium vlivu protinádorových léčiv ellipticinu a doxorubicinu na vybrané nádorové i nenádorové buněčné linie. Zvláštní zřetel byl kladen na rozšíření současných znalostí o metabolismu a cytostatických účincích ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích. Jednalo se také o objasnění mechanismu vzniku resistance nádorových buněk vůči ellipticinu a vysvětlení, jaký vliv na protinádorovou léčbu mohou vykazovat inhibitory histondeacetylas. V neposlední řadě bylo cílem vyvinout apoferritinový nanotransportér, který by byl vhodný pro transport cytostatik do nádorových buněk.

V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

- Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 3A4 enkapsulovanými do nanočásticových systémů liposomů a SupersomůTM.
- Mechanismus vzniku chemoresistence neuroblastomových buněčných linií vůči ellipticinu.
- Vliv kyseliny valproové, inhibitoru histondeacetylas, na cytotoxické účinky ellipticinu v neuroblastomových buňkách, objasnění mechanismu současného působení obou testovaných látek.
- Příprava apoferritinového nanotransportéru pro enkapsulaci ellipticinu a testování jeho účinků na neuroblastomové linie a zdravé buňky fibroblastů.
- Příprava apoferritinového nanotransportéru pro enkapsulaci doxorubicinu cíleného do nádorových buněk prostaty a testování jeho účinků v nádorových i zdravých buněčných liniích.

3. MATERIÁL A METODY

Při vypracování disertační práce byla použita řada biochemických a molekulárně-biologických metod. Jejich podrobný popis je uveden v publikacích a rukopisu, které jsou součástí disertační práce jako přílohy č. 1 – 6.

Pro studium cytotoxicity a mechanismů účinků testovaných látek byly použity nádorové a zdravé tkáňové kultury. Stěžejní část disertační práce je založena na analýse buněk průtokovým cytometrem a metodě ³²P-postlabeling.

Průtoková cytometrie je metoda založená na měření fyzikálně-chemických vlastností buněk během jejich průchodu laserovým paprskem. Principem je použití fluorescenčně značených látek pro sledování požadovaných povrchových nebo intracelulárních znaků buněk. Před detekcí je nutná příprava buněčné suspenze dle požadovaného typu analýsy. V disertační práci to byla detekce apoptosy značením Annexinu V (Apronex s.r.o., Jesenice u Prahy, ČR) a DAPI, průkaz buněk s aktivní caspasou-3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), detekce dvouvláknových zlomů DNA (Biolegend, San Diego, CA, USA) a analýsa distribuce buněčného cyklu. Byly použity různé přístupy značení buněk vždy dle doporučení výrobce – nativní buňky pro detekci apoptosy a pro ostatní analýsy byly buňky permeabilizovány 90% methanolem a následně fixovány 4% formaldehydem. Buněčné vzorky byly analysovány na základě hydrodynamické fokusace v kapiláře cytometru LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA), kde jsou fluorescenční značky konjugované na protilátkách excitovány lasery a emitované světlo je detekováno a zaznamenáno pro každou buňku zvlášť. Data byla vyhodnocena programem FlowLogic (Inivai Technologies, Mentone, Australia).

Analýsy kovalentních aduktů metabolitů ellipticinu s DNA byly provedeny prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu metodou ³²P-postlabeling (Stiborová *et al.*, 2004).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1.1. GENOTOXICITA ELLIPTICINU

4.1.2. Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 3A4 ve formě nanočástic

Produktem oxidace ellipticinu CYP3A4 jsou zejména 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin, reaktivní metabolity, které tvoří dva kovalentní adukty s DNA (Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2015). V disertační práci jsme se zaměřili na přípravu CYP3A4 enkapsulovaného v systému liposomů a SupersomůTM. Nanočásticové formy tohoto enzymu mohou být totiž důležité pro přenos CYP3A4 do nádorových tkání, kde budou aktivovat ellipticin na efektivnější metabolit.

Z výsledků experimentů studujících aktivaci ellipticinu na metabolity tvořící adukty s DNA za využití liposomálních a mikrosomálních systémů CYP3A4 je patrné, že ellipticin po aktivaci tvoří dva kovalentní adukty s DNA. Ty byly detekovány metodou ³²P-postlabeling (Reddy a Randerath, 1986; Schmeiser *et al.*, 2013). Z tabulky 1 je patrné, že tvorba aduktu 1 (Obr. 1) je závislá na koncentraci CYP3A4 v enzymovém systému. CYP3A4 v SupersomechTM aktivoval ellipticin efektivněji pravděpodobně díky přítomnosti cytochromu b₅ a širokému spektru lipidů a proteinů, které v připravených liposomálních nanočásticích absentují.

Tab. 1: Množství aduktů DNA s ellipticinem (100 nM) po jeho aktivaci lidským CYP3A4 enkapsulovaným do liposomálních a SupersomálníchTM nanočástic. Analýza aduktů s DNA byla provedena pomocí metody ³²P-postlabeling. Uvedené hodnoty jsou průměrem 3 nezávislých měření.

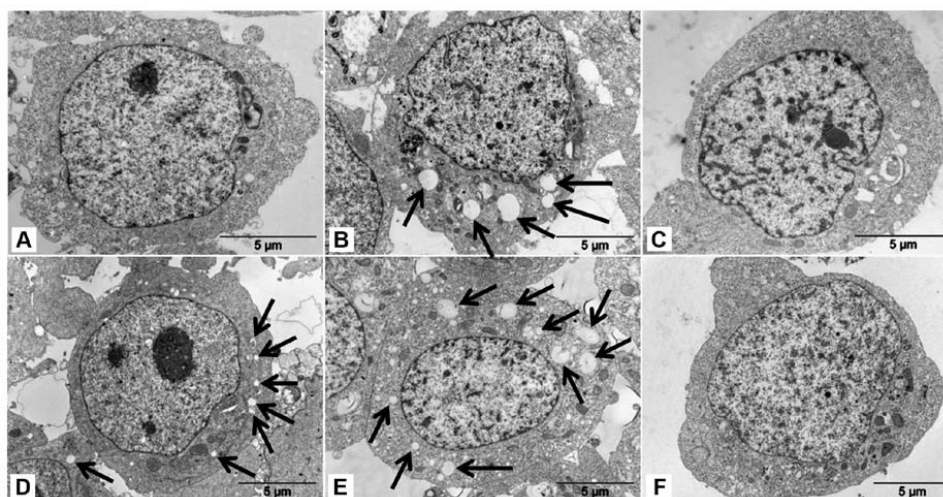
Koncentrace CYP3A4 v nanočásticích	CYP3A4 v liposomech		CYP3A4 v Supersomech TM	
	Množství aduktů ellipticinu s DNA (RAL ^a /10 ⁷)			
	Adukt 1	Adukt 2	Adukt 1	Adukt 2
0 pmol	nedetekováno	0.20±0.03	nedetekováno	0.21±0.03
10 pmol	neměřeno		0.75±0.05	0.21±0.03
50 pmol	1.42±0.08	0.21±0.03	2.10±0.12	0.21±0.03
100 pmol	2.31±0.15	0.20±0.03	3.82±0.26	0.20±0.03
200 pmol	4.22±0.31	0.21±0.03	5.31±0.33	0.21±0.03
250 pmol	4.53±0.34	0.20±0.03	5.60±0.32	0.21±0.03

^a„Relative adduct labeling“ - relativní značení aduktu.

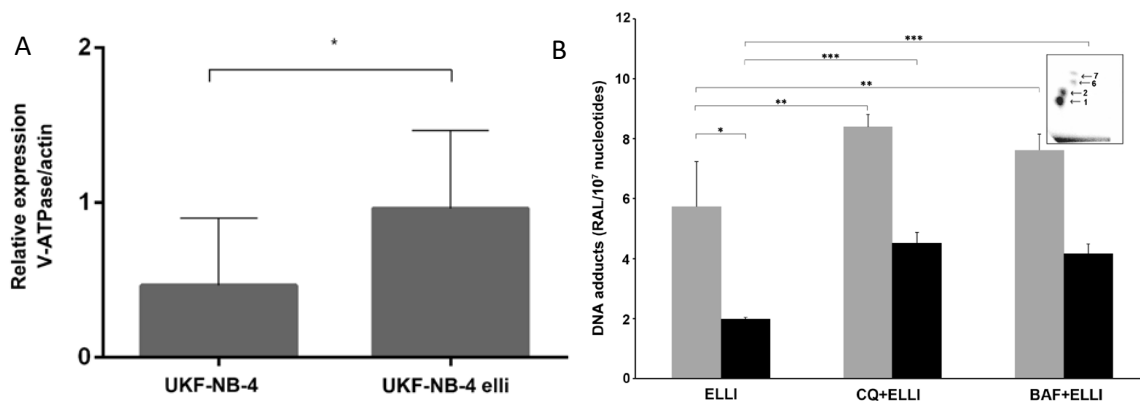
4.1.3. Chemoresistence neuroblastomových buněk indukovaná vakuolizací ellipticinu

Ellipticin indukuje v neuroblastomových liniích apoptosu. Dlouhodobé vystavení neuroblastomových buněk rostoucí koncentraci ellipticinu vede ke vzniku linie resistantní k tomuto léčivu (UKF-NB-4^{ELLI}). V linii UKF-NB-4^{ELLI} je ellipticin v jádrech buněk přítomen v nižší koncentraci než je tomu v případě parentálních buněk, což vede ke snížení toxicity ellipticinu vůči těmto buňkám (Procházka *et al.*, 2012).

Inkubace sensitivní neuroblastomové buněčné linie (UKF-NB-4) a od ní odvozené linie resistantní vůči ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) s 5 μ M ellipticinem vedla k indukci tvorby vakuol v těchto buňkách (Obr. 2B, E). Sekvestrace ellipticinu v lysosomech přispívá ke vzniku resistance neuroblastomových linií vůči tomuto léčivu. Resistance je závislá na expresi V-ATPasy, exprese tohoto proteinu je vyšší v linii UKF-NB-4^{ELLI} než v UKF-NB-4 (Obr. 3A). Ellipticin se tak v cytoplasmě a jádrech vyskytuje v mnohem menších koncentracích. To vede k tvorbě nižšího množství aduktů ellipticinu s DNA (Obr. 3B) a jeho cytotoxické účinky jsou tak sníženy. Inhibitory V-ATPasy bafilomycin A nebo chloroquin snižují akumulaci ellipticinu v těchto kompartmentech, a tím výrazně zvyšují toxicitu ellipticinu pro neuroblastomové buněčné linie (Obr 2C, D).



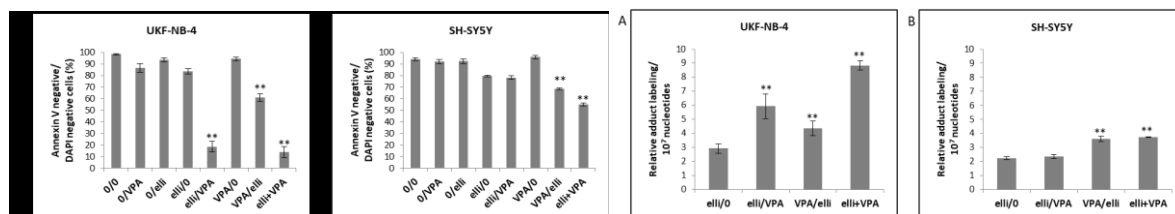
Obr. 2: Obrázky sensitivní neuroblastomová linie (A-C) a linie resistantní vůči ellipticinu (D-E) analysované použitím transmisního elektronového mikroskopu. A) kontrolní buňky UKF-NB-4, B) UKF-NB-4 kultivované s ellipticinem, C) UKF-NB-4 kultivované s ellipticinem a bafilomycinem A, D) kontrolní buňky UKF-NB-4^{ELLI}, E) UKF-NB-4^{ELLI} kultivované s ellipticinem, F) UKF-NB-4^{ELLI} kultivované s ellipticinem a bafilomycinem A.



Obr. 3: A) Expres vakuolární (V)-ATPasy v sensitivní neuroblastomové linii (UKF-NB-4) a v neuroblastomové linii resistantní vůči ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) stanovená metodou Western blot. B) Množství kovalentních aduktů ellipticinu s DNA (součet aduktů 1, 2, 6 a 7 zobrazených ve vloženém obrázku – autoradiografie aduktů ellipticinu s DNA) v buněčných liniích UKF-NB-4 (šedé sloupce) a UKF-NB-4^{ELLI} (černé sloupce) po 24 h inkubaci buněk s ellipticinem (ELLI) buď s, nebo bez předchozí 20 min inkubace s bafilomycinem A (BAF) nebo chloroquinem (CQ).

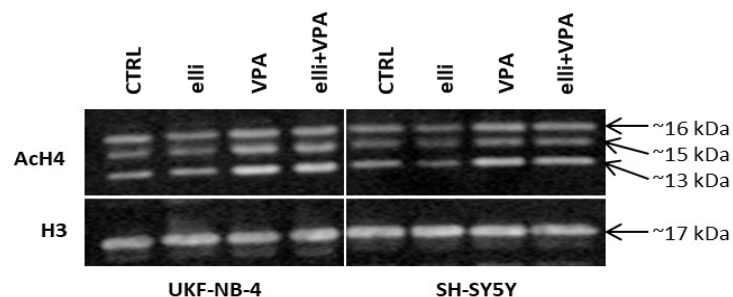
4.2. KYSELINA VALPROOVÁ, INHIBITOR HISTONDEACETYLAS, SYNERGIZUJE ÚČINKY ELLIPTICINU NA NEUROBLASTOMY

VPA potencuje cytotoxické účinky ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 a SH-SY5Y. Potenciace je závislá na sekvenci podání léčiv. Synergický účinek obou léčiv byl však pozorován pouze v případě jejich současného podání nebo v případě, že buňky byly nejprve vystaveny působení ellipticinu a poté VPA (Obr. 4). Po kultivaci obou linií současně s ellipticinem a VPA byla patrná zástava buněk v S fázi buněčného cyklu (oproti kontrolám), což naznačuje, že ellipticin má převládající účinek a snižuje vliv VPA na zástavu cyklu ve fázi G0/G1. Valproát zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4 (Obr. 6), která je důležitá právě pro tuto potenciaci, hlavním mechanismem účinku ellipticinu je totiž tvorba aduktů s DNA (Obr. 5).



Obr. 4: Viabilita buněk A) UKF-NB-4 a B) SH-SY5Y po inkubaci s ellipticinem (elli), kyselinou valproovou (VPA) a jejich různými kombinacemi.

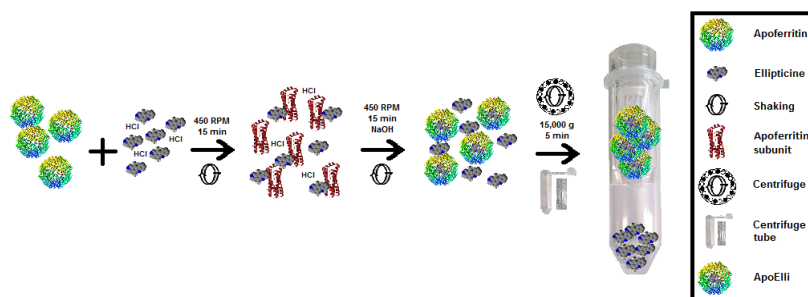
Obr. 5: Množství aduktů ellipticinu s DNA vytvořených v linii A) UKF-NB-4 a B) SH-SY5Y po inkubaci s ellipticinem (elli) samotným nebo v kombinaci s kyselinou valproovou (VPA).



Obr. 6: Vliv ellipticinu (elli), valproátu (VPA) a jejich kombinací na acetylaci histonu H4 v liniích UKF-NB-4 a SH-SY5Y. Expze byla analysována metodou Western blot.

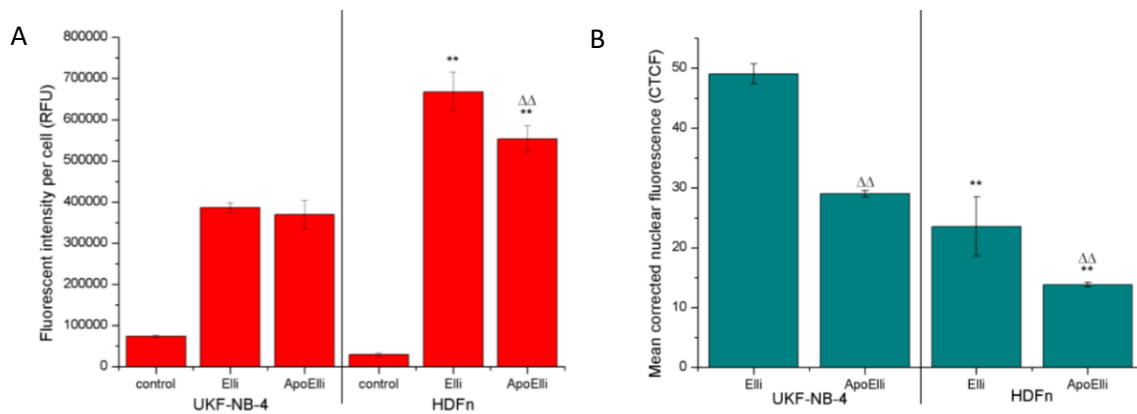
4.3. APOFERRITIN JAKO VHODNÝ NANOTRANSPORTÉR ELLIPTICINU

Apo ferritin (Apo) je ferritin, který ve své dutině neobsahuje ionty železa. V kyselém pH je Apo disociován na podjednotky, po smíchání s ellipticinem a následném zvýšení pH jsou molekuly léčiva uzavřeny v částicích apoferritinu (ApoElli) (Obr. 7).

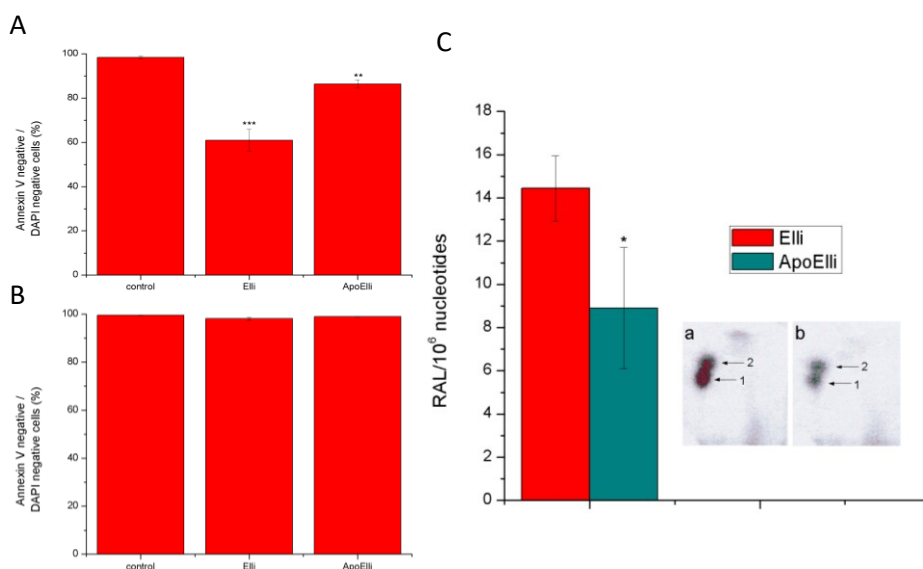


Obr. 7: Schéma enkapsulace ellipticinu do apoferritinu.

Volný ellipticin i jeho ApoElli forma jsou schopny vstupovat do cílových buněk a jejich organel, včetně jádra (Obr. 8). Volný ellipticin i ellipticin uvolněný z ApoElli je v jádrech neuroblastomové linie zodpovědný za poškození DNA tvorbou kovalentních aduktů s DNA (Obr. 9C) a dvouvláknových zlomů. Právě tvorba aduktů ellipticinu s DNA se zdá být klíčovým faktorem cytotoxicity ellipticinu. ApoElli je toxický pro nádorové buňky (Obr. 9A), ale jeho toxicita pro nenádorové fibroblasty je signifikantně nižší (Obr. 9B). Ellipticin a ApoElli jsou v neuroblastomových buňkách internalisovány do jádra, zatímco v lidských fibroblastech jsou sekvastrovány v lysosomech.



Obr. 8: A) Intensity fluorescence ellipticinu v celých buňkách. B) Intensity fluorescence ellipticinu v buněčných jádrech.



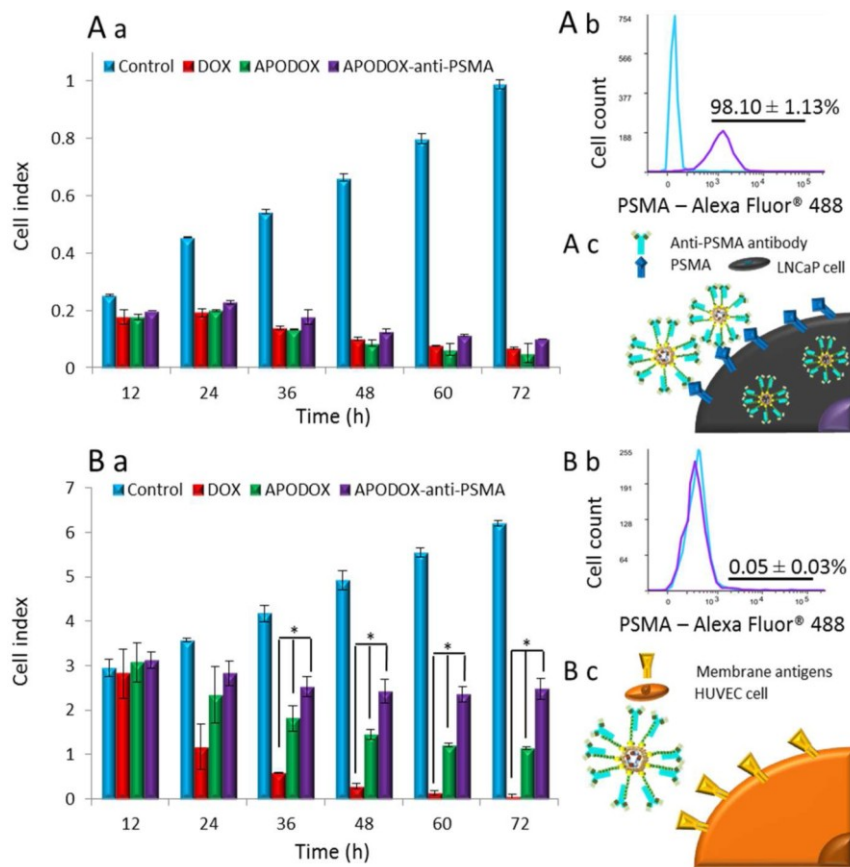
Obr. 9: Apoptosa v buňkách A) UKF-NB-4 a B) lidských fibroblastech HDF indukovaná Elli a ApoElli. C) Množství aduktů ellipticinu s DNA v neuroblastomové linii UKF-NB-4 indukovaná ellipticinem (Elli) a ellipticinem enkapsulovaným v apoferritinu (ApoElli).

4.4. APOFERRITIN KONJUGOVANÝ PROTILÁTKOU JAKO NANOTRANSPORTÉR DOXORUBICINU CÍLENÝ NA PROSTATICKÉ NÁDOROVÉ BUŇKY

Doxorubicin byl enkapsulován do Apo, jehož povrch byl dále modifikován zlatými nanočásticemi, heptapeptidem HWRGWVC a protilátkou proti specifickému prostatickému membránovému antigenu (PSMA). Vliv každého z ligandů na geometrii a „cílicí“ schopnosti připraveného nosiče byl testován metodou ELISA.

Prokázali jsme, že takto připravený nanotransportér specificky „cílí“ na prostatické nádorové buňky LNCaP, které exprimují na svém povrchu PSMA (Obr. 10A). Modifikace

povrchu nanotransportéru zároveň snížila toxické účinky doxorubicinu ve zdravých buňkách, které neexprimují PSMA (Obr. 10B).



Obr. 10: Vliv DOX, APODOX a APODOX-anti-PSMA na A-a) prostatickou nádorovou linii LNCaP a B-a) nenádorovou linii HUVEC, stanovený metodou xCELLigence. Exprese PSMA v buňkách A-b) LNCaP a B-b) HUVEC (azurová – kontrola, fialová – buňky s protilátkou) detekovaná průtokovou cytometrií. Schématické znázornění interakcí mezi protilátkami navázanými na APODOX-anti-PSMA a A-c) antigeny na povrchu buněk LNCaP nebo B-c) buňkami HUVEC, které PSMA neexprimují.

5. ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí metabolismu protinádorového léčiva elliptycinu a jeho účinků na nádorové buněčné linie. Prohlubuje také znalosti problematiky nádorové terapie obecně. Cíle disertační práce byly naplněny a nejdůležitější získané poznatky lze shrnout následovně:

- Cytochrom P450 3A4 enkapsulovaný v liposomálních a mikrosomálních systémech oxiduje ellipticin na aktivační metabolity, které tvoří adukty s DNA.
- Indukce resistance neuroblastomových buněk vůči elliptycinu je způsobená zvýšenou expresí vakuolární ATPasy.
- Kyselina valproová, inhibitor histondeacetylas, potencuje cytotoxické účinky elliptycinu v neuroblastomových buňkách.
- Apoferritin je vhodným nanotransportérem pro transport elliptycinu do nádorových buněk.
- Apoferritin konjugovaný s protilátkou proti specifickému prostatickému membránovému antigenu (PSMA) specificky „cílí“ na prostatické nádorové buňky, které na svém povrchu exprimují PSMA.

Curriculum vitae

Osobní informace

Tereza Černá
2.3.1989
Betlémská 9, Praha 1, 110 00
+420 606 754 753
terezcern@gmail.com

Vzdělání

2014 – současnost Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Biochemie, Laboratoř solidních nádorů Kliniky dětské hematologie a onkologie v Motole – doktorské studium, Praha
Disertační práce na téma: Studium mechanismu účinku protinádorových léčiv na neuroblastomy

2012 – 2014 Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Biochemie – magisterské studium, Praha
Diplomová práce na téma: Srovnání vlastností buněčných linií rezistentních k ellipticinu, doxorubicinu a cisplatině

2009 – 2012 Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Biochemie – bakalářské studium, Praha
Bakalářská práce na téma: Izolace proteinů z oviduktální tekutiny prasnice afinitní chromatografií na DNA-celulose

Profesní zkušenosti

2016 – současnost Vědecký pracovník, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol

2014 – současnost Vědecký pracovník, katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK

2014 – současnost Participace na výuce Praktika z laboratorní techniky biochemie pro studenty oboru biochemie, Přírodovědecká fakulta UK

Další Hlavní řešitel grantového projektu: „Mechanismus působení doxorubicinu a ellipticinu enkapsulovaných v apoferritinových nanotransportérech na nádorové buňky – studie *in vitro*“ (GAUK 998217)
Spoluřešitel grantového projektu: „Epigeneticky podmíněná chemorezistence nádorových buněk“ (GAUK 812217)
Spoluřešitel grantového projektu: „Význam exprese dlouhé nekódující RNA MIAT v hypoxii a chemorezistenci“ (GAUK 716218)
Spoluúčast na řešení grantového projektu: GAČR 18-10251S

Jazykové znalosti

Anglický jazyk : FCE (jazyková zkouška úrovně B2), 2016

**Charles University, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Doctoral study programme: Biochemistry

Summary of the Doctoral thesis



Study of the mechanism of anticancer drug action on neuroblastomas

Mgr. Tereza Černá

Supervisor: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Supervisor-consultant: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Prague, 2018

1. INTRODUCTION

1.1. Carcinogenesis and hallmarks of cancer cells

Cancer is one of the leading public health problems and the second most common cause of death in human population. About 80,000 patients with malignant neoplasm are newly diagnosed in Czech Republic and about 30,000 patients die because of cancer every year (www.linkos.cz, www.szu.cz, www.svod.cz).

Tumor diseases may result from combination of genetic and environmental (chemical, physical and biological) factors. The multistep process of carcinogenesis can be divided into at least three stages – initiation, promotion and progression (Pitot, 1993).

The hallmarks of cancer comprise biological capabilities acquired during the multistep development of human tumors. They include sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, resisting cell death, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis, and activating invasion and metastasis (Hanahan and Weinberg, 2011).

1.2. Chemotherapy

Chemotherapy is cancer treatment that uses anti-cancer drugs (cytostatics) as a part of standardized chemotherapy regimen. The use of cytostatics constitutes systemic therapy. Chemotherapeutic agents are cytotoxic by means of interfering with cell cycle and/or metabolic processes of cancer cells. Their cytotoxic activity is non-selective. Cells that divide rapidly including not only tumor cells, but also some healthy cells are sensitive to treatment with anti-mitotic drugs (Klener, 2011).

1.2.1. Ellipticine

Ellipticine (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole) is a plant alkaloid that exhibits high antineoplastic activity and relatively low side-effects (Stiborová *et al.*, 2003; DeMarini, 1983). The mechanisms of ellipticine action have however not been exactly explained as yet. Ellipticine acts by several mechanisms such as:

- 1) intercalation into a double helix structure of DNA, resulting from the shape and size of the ellipticine molecule (Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2006);
- 2) inhibition of topoisomerase II which results in the formation of double strand DNA breaks (Froelich-Ammon *et al.*, 1995);

- 3) inhibition of p53 phosphorylation, the accumulation of dephosphorylated p53 may induce apoptosis (Ohashi *et al.*, 1995);
- 4) inhibition of oxidative phosphorylation dramatically decreasing ATP levels in mitochondria and disturbing the energy balance of the cell (Schwaller *et al.*, 1995);
- 5) inhibition of telomerase (Auclair, 1989);
- 6) formation of DNA adducts; ellipticine after its metabolic activation to the pharmacological more efficient metabolites, covalently binds to DNA. Therefore, it can act as an alkylation (arylation) agent (Stiborová *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 2003; Stiborová *et al.*, 2004).

Ellipticine is oxidized by cytochromes P450 (CYP) to five metabolites – 7-hydroxyellipticine, 9-hydroxyellipticine, 12-hydroxyellipticine, 13-hydroxyellipticine and *N*²-oxide of ellipticine (Stiborová *et al.*, 2004) (Fig. 1). Of the CYP enzymes investigated, human CYP1A1, 1A2 and 1B1 are involved in the detoxification of ellipticine. CYP3A4, 2C9, 2D6 and 1A2 are involved in activation of ellipticine (Stiborová *et al.*, 2003; Stiborová *et al.*, 2006). The detoxification metabolites of ellipticine (7-hydroxyellipticine and 9-hydroxyellipticine) enter the II. biotransformation phase and they are excreted from the body. The reactive metabolites of ellipticine (12-hydroxyellipticine, 13-hydroxyellipticine and *N*²-oxide ellipticine) are responsible for the formation of covalent DNA-adducts (Stiborová *et al.*, 2007).

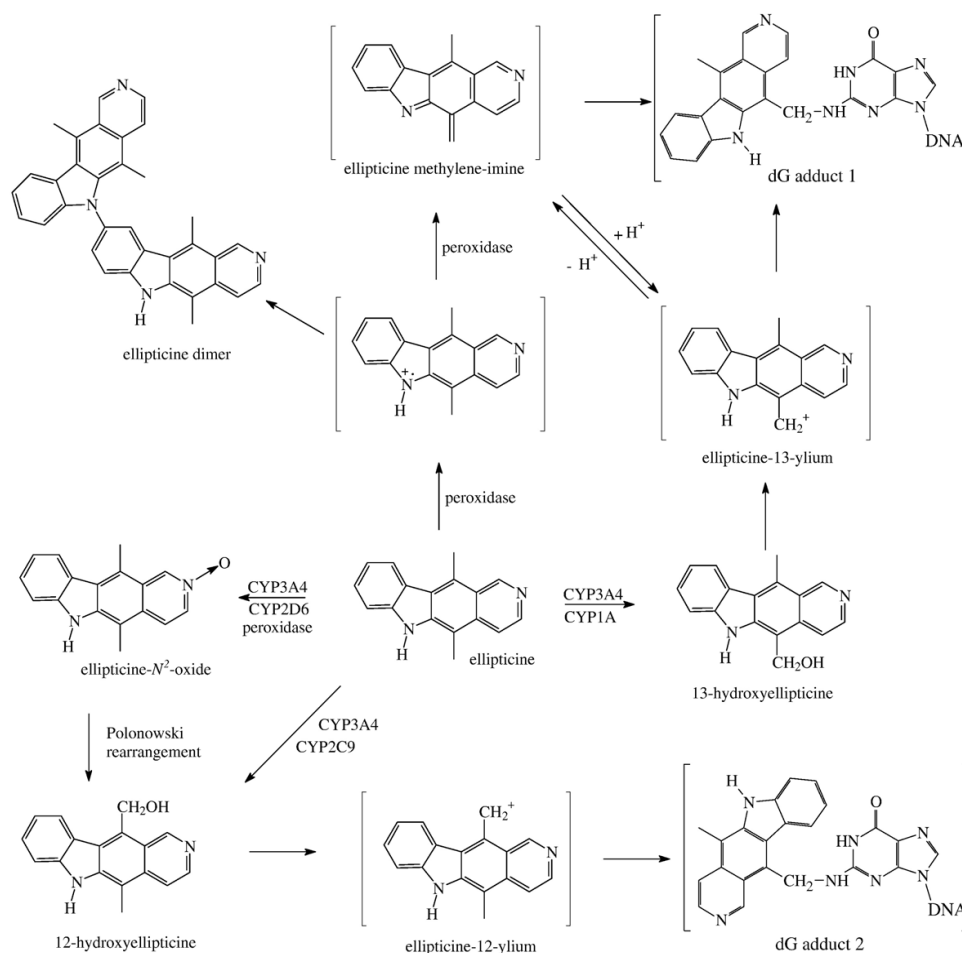


Fig. 1: Metabolism of ellipticine by human cytochrome P450 showing the characterized metabolites and those proposed to form DNA adducts. The compounds shown in brackets were not detected under the experimental conditions (Stiborová et al., 2008).

1.2.2. Doxorubicin

Although anthracycline antibiotic doxorubicin is the drug, which is extensively clinically used, the mechanisms of its anti-cancer effects have not exactly been explained as yet.

Doxorubicin exhibits several mechanisms such as:

- 1) intercalation into a double-helical structure of DNA resulting in inhibition of macromolecule synthesis (Gewirtz, 1999);
- 2) formation of free radicals and reactive oxygen species (ROS) that cause DNA damage or lipid peroxidation, that may be responsible for cardiotoxicity of anthracyclines (Marnett et al., 2003);
- 3) binding to DNA and alkylation (Minotti et al., 2004);
- 4) DNA cross-linking (Gewirtz, 1999);

- 5) inhibition of topoisomerase II leading to the formation of double strand breaks in DNA and the induction of apoptosis (Binachi et al., 1997; Binachi et al., 2000).

1.2.3. Histone deacetylase inhibitors in anti-cancer therapy

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors are well tolerated and clinically effective against hematological malignancies, but they are not effective in solid tumors when used alone (Duvic *et al.*, 2007, Modesitt *et al.*, 2008; Luu *et al.*, 2008). However, they exhibit additive or synergistic anti-cancer effects in combination with chemotherapy, targeted drugs and radiation therapy (Rosato and Grant, 2004, Bhalla, 2005, Marks and Dokmanovic, 2005, Bolden *et al.*, 2006).

Valproic acid (VPA) is medication primarily used to treat epilepsy, migraine, bipolar disorder and other psychiatric disorders (Chateauvieux *et al.*, 2010). Nowadays, VPA has been tested in clinical trials as an anti-cancer drug because of its inhibition of HDAC (Terbach and Williams, 2009). The mechanism of effect of valproate on tumor cells is not well-known. VPA acts as a class I and II HDAC inhibitor (Gottlicher *et al.*, 2001; Phiel *et al.*, 2001), activates proteasome degradation, inhibits protein kinase C (Blaheta et al., 2002), demethyls DNA and exhibits antiangiogenic effects (Michaelis *et al.*, 2004). An important mechanism of anticancer effect of VPA is probably hyperacetylation of histone H3 and H4 and other "non-histone" proteins due to HDAC inhibition (Phiel *et al.*, 2001). Valproic acid has been investigated in recent years mainly because of its potential in anti-cancer therapy combined with cytostatic agents.

1.2.4. Nanotransporters as carriers of anticancer drugs

Nanotransporters are submicron particles (usually <500 nm) (Neubert, 2011), which have the ability to alter the properties and bioactivity of drugs due to their large surface-to-volume ratio. Their use in antitumor therapy can significantly improve the pharmacological and pharmacokinetic effects of cytostatics, improve their biodistribution, increase the stability and solubility of the drug, and reduce toxic side effects. In addition, nanotransporters can carry multiple drugs or compounds at the same time (Mishra *et al.*, 2010).

Apo ferritin (Apo) belongs to the group of protein (peptide) nanoparticles. Apo naturally occurs as a protein component of ferritin, which forms a cage, where iron ions can be stored. This intracellular protein consists of 24 subunits with a cavity of diameter 8 nm. The internal cavity is suitable for encapsulation of anticancer drugs. The advantage of the Apo nanocarrier

is its internalization into cells via transferrin receptor TfR1 or scavenger receptor class A member 5 (SCARA5) that are overexpressed by some tumor cells. In addition, this naturally occurring protein does not induce any immune response of the organism and its surface may be further modified by ligands (Gallois *et al.*, 1997, Kilic *et al.*, 2012, Blazkova *et al.*, 2013, Mendes-Jorge *et al.*, 2014).

2. AIMS OF THE STUDY

Despite all advances in cancer diagnosis and therapy, treatment of cancers is difficult and therapeutic approaches are often inadequate. The aim of this thesis was to study effects of anti-cancer drugs ellipticine and doxorubicin on selected cancer and healthy cell lines. Specific consideration was given to expand current knowledge about the metabolism and cytostatic effects of ellipticine in neuroblastoma cell lines. Moreover, the mechanism of development of resistance to ellipticine and the effect of histone deacetylase inhibitors on anti-cancer therapy were investigated. The aim of this study was also to develop an apoferritin nanocarrier suitable for the active transport of cytostatics into cancer cells.

The aims of the present work are as follows:

- To investigate the metabolism of ellipticine by cytochrome P450 3A4 encapsulated in liposomal and SupersomalTM nanoparticle systems.
- To investigate the mechanism of development of ellipticine-resistance in neuroblastoma cells.
- To investigate the effect of valproic acid, histone deacetylase inhibitor, on the cytotoxicity of ellipticine in neuroblastoma cells and the mechanism of simultaneous treatment of both tested substances.
- To prepare apoferritin nanotransporter with encapsulated ellipticine and to characterize its effects on neuroblastoma lines and healthy fibroblasts.
- To prepare apoferritin nanotransporter with encapsulated doxorubicin targeted to prostate cancer cells and to investigate its effects in tumor and healthy cell lines.

3. MATERIALS AND METHODS

Various biochemical and molecular-biological methods were used during the experimental work. These methods are described in papers and the manuscript attached to this thesis as attachments no. 1 -6 in details.

Cancer and non-malignant cell lines were used to study the cytotoxicity and mechanism of action of tested drugs. The majority of experiments carried out in the thesis utilized the flow cytometry analysis and the ³²P-postlabeling method.

The flow cytometry is a method based on the measurement of chemophysical properties of cells during their laser beam passage. Using a flow cytometer, cells or other particles suspended in a liquid stream are passed through a laser light beam in single file fashion, and interaction with the light is measured by an electronic detection apparatus as light scatter and fluorescence intensity. If a fluorescent label, or fluorochrome, is specifically and stoichiometrically bound to a cellular component, the fluorescence intensity will ideally represent the amount of that particular cell component. Cell suspensions were prepared according to the type of analysis prior to detection. The analysis of apoptosis using Annexin V (Apronex sro, Jesenice u Prahy, Czech Republic) and DAPI double staining assay, detection of cells with active caspase-3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), detection of double-strand DNA breaks (Biolegend, San Diego, CA, USA) and cell cycle distribution assays were used in this doctoral thesis. To analyze protein expression levels, intracellular and extracellular antigens were stained in tested cells. Before staining, cells were fixed using 2 % formaldehyde and when measuring intracellular proteins also permeabilized in solution of 90 % methanol in PBS. In experiments, LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA) was used to detect fluorescent labels conjugated with antibodies of proteins of our interest. Emitted light was detected according its wavelength for every single cell. Acquired cytometric data were analyzed by Flow Logic (Inivai Technologies, Balcombe, Australia).

DNA adducts were analyzed by ³²P-postlabeling by prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc, in German Cancer Research Center in Heidelberg (Stiborová et al., 2004).

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. GENOTOXICITY OF ELLIPTICINE

4.1.1. Oxidation of ellipticine by cytochrome P450 3A4 enzyme systems in nanoparticles

Of the CYP enzymes investigated, human CYP3A4 is one of the most active enzymes oxidizing ellipticine to 12-hydroxy- and 13-hydroxyellipticine, the reactive metabolites that dissociate to ellipticine-12-ylum and ellipticine-13-ylum, which bind to DNA (Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2015). In the study, we aimed to prepare CYP3A4 encapsulated in liposomal and SupersomalTM nanoparticles. Enzyme nanoparticles may be suitable for delivery of the CYP3A4 enzyme to the cancer cells.

Both nanoparticle systems containing CYP3A4 activated ellipticine to metabolites forming DNA adducts. Using the ³²P-postlabeling assay found to be suitable to detect and quantify the ellipticine-derived DNA adducts (Reddy and Randerath, 1986; Schmeiser *et al.*, 2013), we analyzed the formation of these adducts formed by the nanoparticle enzyme systems. As shown in table 1, the formation of adduct 1 (Fig. 1) seems to be dependent on concentrations of human CYP3A4 in nanoparticle enzyme systems. The effectiveness of CYP3A4 present in the SupersomalTM system is higher than that of CYP3A4 in the liposomal nanoparticles probably due to the presence of cytochrome b₅ and all spectrum of lipids and proteins in the membrane of SupersomesTM.

Tab. 1: Levels of ellipticine-derived DNA adducts formed from ellipticine after activation with human CYP3A4 present in liposomal and SupersomalTM nanoparticles. Analyses were performed by the ³²P-postlabeling assay. Averages of three determinations in separate experiments are shown.

Concentration of CYP3A4 in nanoparticles	CYP3A4 in liposomes		CYP3A4 in Supersomes TM	
	Levels of ellipticine-derived DNA adducts (RAL ^a /10 ⁷)			
	Adduct 1	Adduct 2	Adduct 1	Adduct 2
0 pmol	not detectable	0.20±0.03	not detectable	0.21±0.03
10 pmol	not measured		0.75±0.05	0.21±0.03
50 pmol	1.42±0.08	0.21±0.03	2.10±0.12	0.21±0.03
100 pmol	2.31±0.15	0.20±0.03	3.82±0.26	0.20±0.03
200 pmol	4.22±0.31	0.21±0.03	5.31±0.33	0.21±0.03
250 pmol	4.53±0.34	0.20±0.03	5.60±0.32	0.21±0.03

^aRelative adduct labeling

4.1.2. Sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells

Ellipticine induces apoptosis in neuroblastoma cell lines. Long-term exposure of these cells to increasing concentrations of ellipticine leads to a drug-resistant cells (UKF-NB-4^{ELLI}), where ellipticine is present at a lower concentration in the cell nuclei than in the parental cells, resulting in a reduction of ellipticine toxicity to these cells (Procházka *et al.*, 2012).

Treatment of neuroblastoma cells, both sensitive (UKF-NB-4) and resistant to ellipticine (UKF-NB-4^{ELLI}), with 5 μ M ellipticine induced extensive cytoplasmic vacuolization in these cells (Fig. 2B, E). The sequestration of ellipticine in lysosomes contributes to the development of ellipticine-resistance in these cells. We demonstrated that this resistance is, among other mechanisms, dependent on upregulation of the V-ATPase gene. We found that the V-ATPase protein expression is enhanced in the ellipticine-resistant UKF-NB-4^{ELLI} cell line (Fig. 3A). This sequestration results in lower nuclear accumulation of ellipticine and lower DNA damage by ellipticine and therefore also lower toxic effects to neuroblastoma cells (Fig. 3B). Bafilomycin A- and chloroquine-mediated inhibition of ellipticine sequestration into vacuoles led to higher concentrations of ellipticine in cytoplasm and nuclei that results in significantly increased cytotoxicity of ellipticine (Fig. 2C, D).

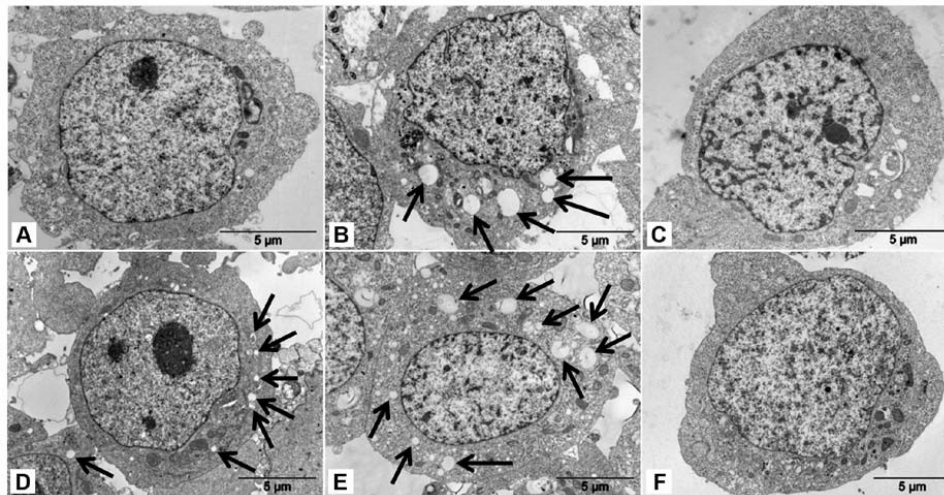


Fig. 2: Transmission electron microscope images show a significant vacuolization of cytoplasm in (A-C) UKF-NB-4 ellipticine-sensitive and (D-F) UKF-NB-4^{ELLI} ellipticine resistant cell lines after exposure to ellipticine. UKF-NB-4 cell line (A) control; (B) treatment with ellipticine; (C) treatment with bafilomycin A and ellipticine; UKF-NB-4^{ELLI} cell line (D) control; (E) treatment with ellipticine; (F) treatment with bafilomycin A and ellipticine.

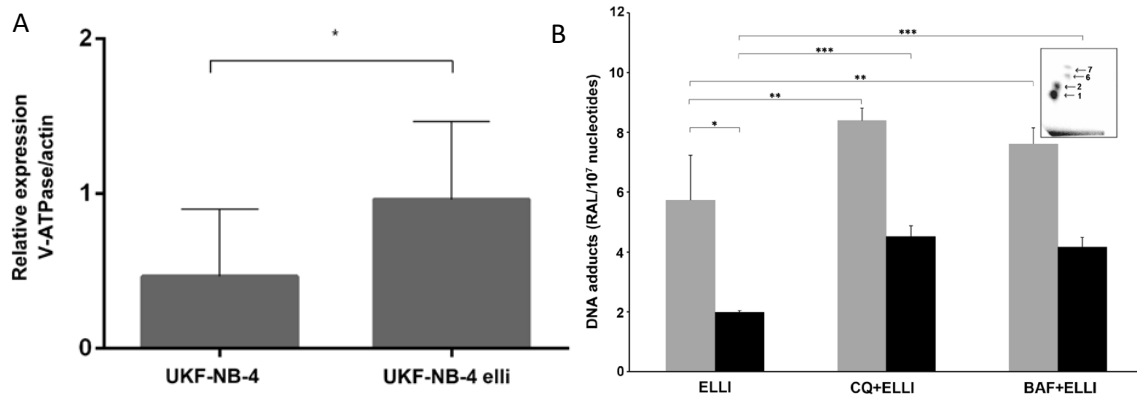


Fig. 3: A) Expression of vacuolar (V)-ATPase protein detected by western blotting in UKF-NB-4 ellipticine-sensitive and UKF-NB-4^{ELLI} ellipticine-resistant cell lines. B) Levels of covalent DNA adducts (sum of adducts 1, 2, 6 and 7 shown in insert) formed in UKF-NB-4 (grey columns) and UKF-NB-4^{ELLI} (black columns) neuroblastoma cells after treatment with ellipticine (ELLI) either without pretreatment or pretreatment with bafilomycin A (BAF) or chloroquine (CQ).

4.2. THE HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR VALPROIC ACID EXERTS A SYNERGISTIC CYTOTOXICITY WITH ELLIPTICINE IN NEUROBLASTOMA CELLS

Treatment of neuroblastoma cells VPA combined with ellipticine resulted in their synergistic antitumor effect in UKF-NB-4 and SH-SY5Y cell lines. However, the VPA-mediated sensitization of neuroblastoma cells to ellipticine was dependent on the sequence of drug administration; the potentiating effect was only detected when the cells were pretreated with ellipticine before their exposure to VPA (Fig. 4). Both UKF-NB-4 and SH-SY5Y cells accumulated in the S phase of cell cycle when treated with ellipticine in combination with VPA. This finding indicates that influencing of S phase of cell cycle by ellipticine with VPA is the predominant effect, which diminishes the influence of VPA on the arrest of G0/G1 phase. Exposure of tested cells to VPA resulted in an increase in acetylation of histones H3 and H4 (Fig. 6), which dictates an easier accessibility of DNA to ellipticine in cells and resulted in increased levels of ellipticine-derived DNA adducts (Fig. 5).

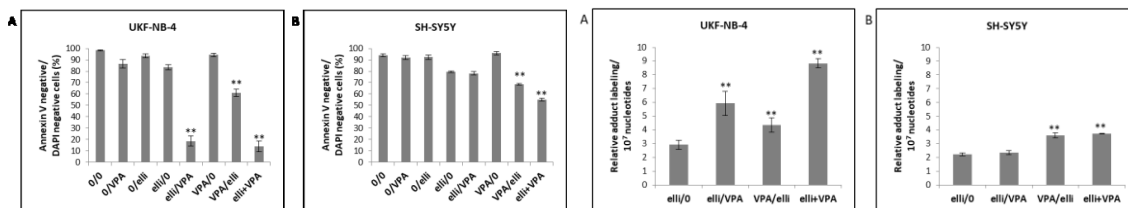


Fig. 4: Viability of A) UKF-NB-4 and B) SH-SY5Y cells after incubation with ellipticine (elli) or valproic acid (VPA) and their various combinations.

Fig. 5: Total levels of ellipticine-derived DNA adducts formed in A) UKF-NB-4 and B) SH-SY5Y cell lines after treatment with ellipticine (elli) and with this drug combined with valproic acid (VPA) determined by ³²P-postlabeling.

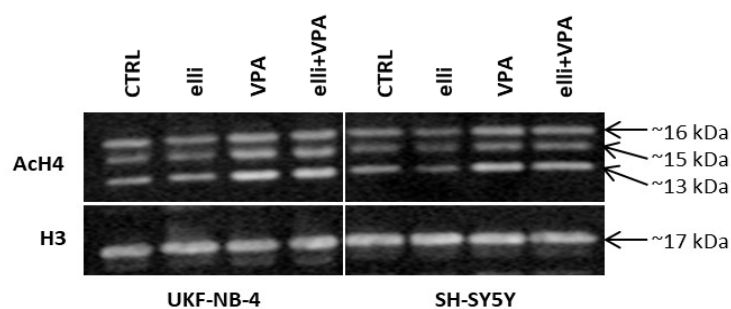


Fig. 6: Western blot analysis of acetylated histone H4 (AcH4) in extracts from UKF-NB-4 and SH-SY5Y cells treated with ellipticine (elli), VPA and their combination.

4.3. APOFERRITIN NANOCARRIER AS A SUITABLE NANOTRANSPORTER OF ELLIPTICINE

Apo ferritin (Apo), the iron-free form of ferritin, is known to reversibly dissociate and associate, which are processes dependent on pH. When Apo is disassembled after mixing it with ellipticine (Elli), these drug molecules can encapsulate within the Apo cavity once reassembled (ApoElli) (Fig. 7).

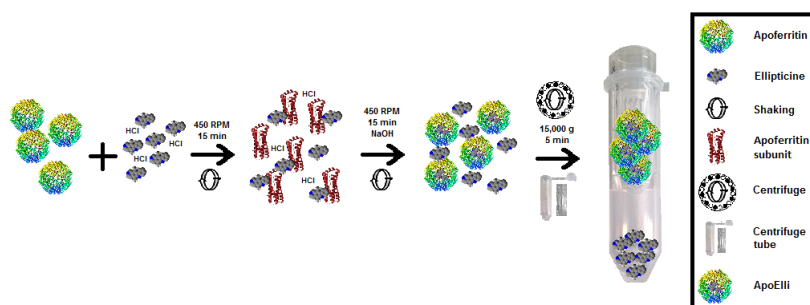


Fig. 7: Scheme of preparation of ApoElli nanoparticles.

Apo ferritin can be used to effectively delivery the anticancer agent ellipticine into cancer cells. We showed that ellipticine is able to be encapsulated by apoferritin and subsequently be released from its ApoElli form. Both forms of ellipticine entering UKF-NB-4 neuroblastoma cells (Fig. 8) generated covalent DNA adducts (Fig. 9C) and caused DNA double strand breaks. ApoElli was toxic in UKF-NB-4 neuroblastoma cells (Fig. 9A), but showed significantly lower cytotoxicity in non-malignant fibroblast HDFn (Fig. 9B). Ellipticine either free or released from ApoElli was concentrated in the nuclei of neuroblastoma cells. In HDFn cells the higher amounts of ellipticine were sequestered in lysosomes.

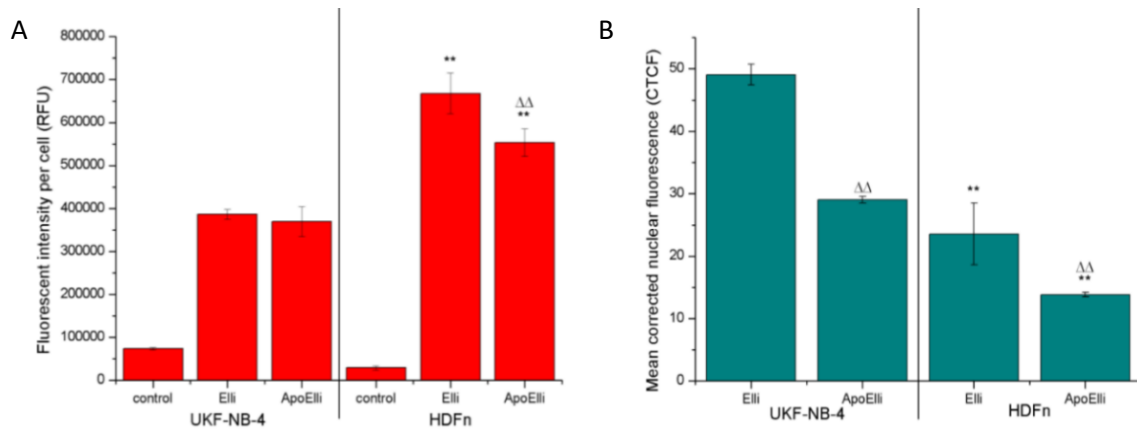


Fig. 8: A) Fluorescence intensities (RFU, relative fluorescence units) of ellipticine in the whole cells. B) Fluorescence intensities of ellipticine in cell nuclei.

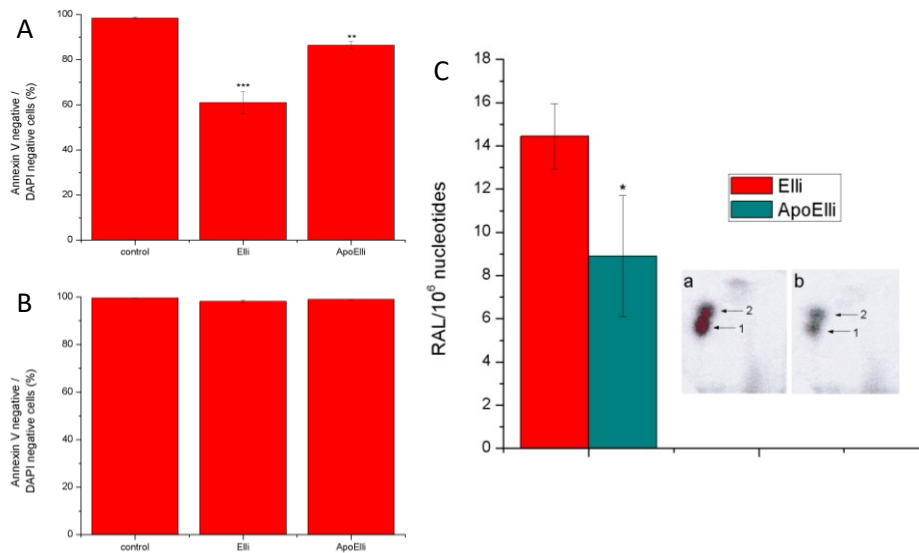


Fig. 9: Apoptosis in A) neuroblastoma UKF-NB-4 and B) HDFn cells induced by ellipticine (Elli) and ApoElli. C) Ellipticine-derived DNA adduct formation in neuroblastoma UKF-NB-4 cells treated with ellipticine (Elli) or ApoElli determined by ³²P-postlabeling.

4.4. CONJUGATION OF ANTIBODIES TO APOFERRITIN NANOCARRIER WITH ENCAPSULATED DOXORUBICIN FOR TARGETED DRUG DELIVERY TO PROSTATE CANCER CELLS

Doxorubicin was encapsulated into Apo and its surface was modified with gold nanoparticles, HWRGWVC peptide and monoclonal antibody against prostate specific membrane antigen (PSMA). The influence of each component on nanocarrier ability to bind selectively to the target molecule was studied using a method similar to direct ELISA.

We proved, that PSMA, which is present on the surface membrane of LNCaP cells, enables the targeted nanocarrier to enter these prostate cancer cells and deliver the drug inside. However, the entry of targeted nanocarrier to nonmalignant cells expressing no PSMA antigens is hindered.

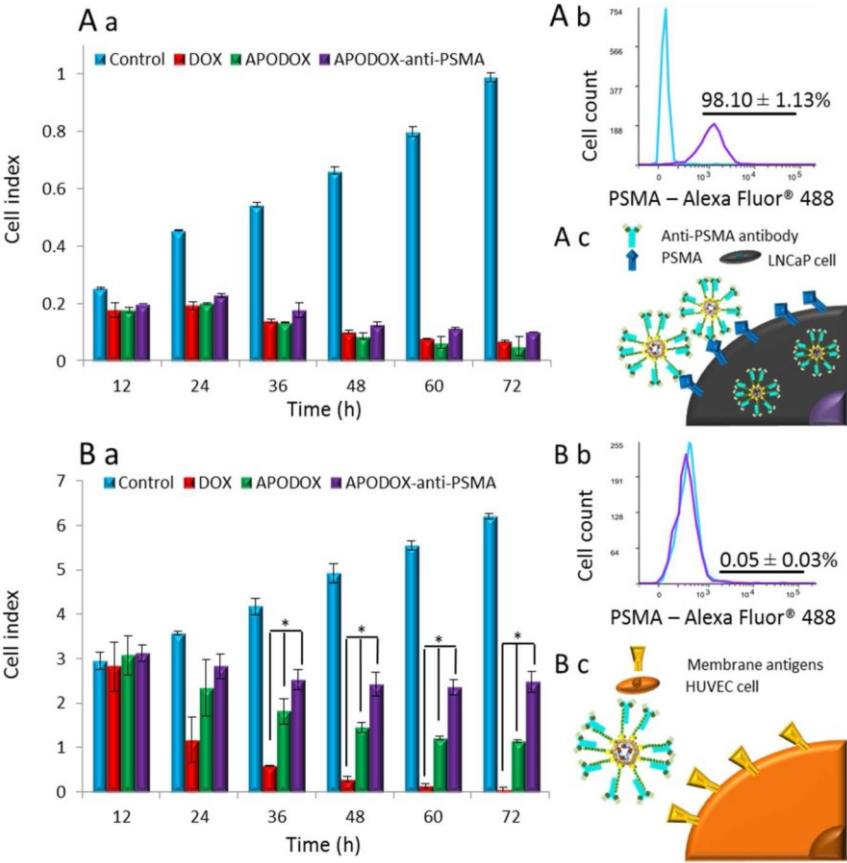


Fig. 10: Effect of DOX, APODOX, and APODOX-anti-PSMA on A-a) prostate cancer line LNCaP and B-a) non-malignant line HUVEC determined by xCELLigence. PSMA expression in cells A-b) LNCaP and B-b) HUVEC (cyan - control, purple - cells with antibody) analysed by flow cytometry. Schematic depiction of interactions between nanocarrier and A-c) LNCaP expressing PSMA antigen and B-c) HUVEC cells with limited expression of PSMA antigen.

5. CONCLUSIONS

The doctoral thesis contributes to our knowledge on the metabolism of anticancer drug ellipticine and its effect on cancer cell lines. It also increases our knowledge of anti-cancer therapy in general. Aims of this doctoral thesis were met and results found in the thesis can be summarized as follows:

- Cytochrome P450 3A4 encapsulated in liposomal and microsomal systems activates ellipticine to metabolites forming DNA adducts.
- Ellipticine-resistance in neuroblastoma cells is dependent on enhanced protein expression of vacuolar ATPase.
- The histone deacetylase inhibitor valproic acid potentiates the cytotoxic effect of ellipticine in neuroblastoma cells.
- Apoferritin is a suitable nanocarrier for ellipticine transport into cancer cells.
- Apoferritin conjugated with antibody against prostate specific membrane antigen (PSMA) targets prostate cancer cells expressing PSMA on their surface.

Curriculum vitae

Personal Information

Tereza Černá
2nd March 1989
Betlémská 9, Praha 1, 110 00
+420 606 754 753
terezcern@gmail.com

Education

2014 – present
Charles University in Prague, Faculty of Science, PhD program in Biochemistry
Doctoral thesis: Study of mechanism of action of anticancer drugs on neuroblastoma

2012 – 2014
Charles University in Prague, Faculty of Science, Master studies in Biochemistry
Diploma thesis: The comparison of properties of cell lines resistant to ellipticine, doxorubicin and cisplatin

2009 – 2012
Charles University in Prague, Faculty of Science, Bachelor studies in Biochemistry
Bakalářská práce na téma: Isolation of proteins from sow oviductal fluid by affinity chromatography on DNA-cellulose

Professional experience

2016 – present
Research fellow at Department of Paediatric Haematology and Oncology, Charles University in Prague, 2nd Faculty of Medicine

2014 – present
Research fellow at Department of Biochemistry, Charles University in Prague, Faculty of Science

2014 – present
Participation in Practical course in biochemistry laboratory techniques for students, Charles University in Prague, Department of Biochemistry

Další
Principal researcher of a grant project: „The mechanism of action of doxorubicin and ellipticin encapsulated in apoferritin nanotransporters on tumor cells – *in vitro* study“ (GAUK 998217)
Co-researcher of a grant project: „Epigenetically conditioned chemoresistance of cancer cells“ (GAUK 812217)
Co-researcher of a grant project: „Importance of long non-coding RNA MIAT expression in hypoxia and chemoresistance“ (GAUK 716218)
Participation in solving the grant: GAČR 18-10251S

Language skills

English: FCE (level B2), 2016

Použitá literatura/References

- Auclair C: Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series. *Arch Biochem Biophys.* 1987, 259:1-14.
- Bhalla KN: Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J Clin Oncol.* 2005, 23:3971–3993.
- Binaschi M, Capranico G, Dal Bo L, Zunino F: Relationship between lethal effects and topoisomerase II mediated double-strand DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. *Mol Pharmacol.* 1997, 51:1053-1059.
- Binaschi M, Farinosi R, Borgnetto ME, Capranico G: In vivo site specificity and human isoenzyme selectivity of two topoisomerase II-poisoning anthracyclines. *Cancer Res.* 2000, 60:3770-3776.
- Blaheta RA, Nau H, Michaelis M, Cinatl J Jr: Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem.* 2002, 9:1417-1433.
- Blazkova I, Nguyen HV, Dostalova S, Kopel P, Stanisavljevic M, Vaculovicova M, Stiborova M, Eckschlager T, Kizek R, Adam V: Apoferritin Modified Magnetic Particles as Doxorubicin Carriers for Anticancer Drug Delivery. *Int J Mol Sci.* 2013, 14:3391–13402.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW: Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2006, 5:769–784.
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M: Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol.* 2010, 2010:479364.
- DeMarini DM, Cros S, Paoletti C, Lecointe P, Hsie AW: Mutagenicity and cytotoxicity of five antitumor ellipticines in mammalian cells and their structure-activity relationships in Salmonella. *Cancer Res.* 1983, 43:3544- 3552.
- Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Chiao JH, Reilly JF, Ricker JL, Richon VM, Frankel SR: Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood.* 2007, 109:31–39.
- Froelich-Ammon SJ, Patchan MW, Osheroff N, Thompson RB: Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem.* 1995, 270:14998-15004.
- Gallois B, dEstaintot BL, Michaux MA, Dautant A, Granier T, Precigoux G, Soruco JA, Roland F, ChavasAlba O, Herbas A, Crichton RR: X-ray structure of recombinant horse L-chain apoferritin at 2.0 angstrom resolution: implications for stability and function. *J Biol Inorg Chem.* 1997, 2:360–367.
- Gewirtz DA: A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999, 57:727-741.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001, 20:6969-6978.
- Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011, 144:646-674.

- Kilic MA, Ozlu E, Calis S: A Novel Protein-based Anticancer Drug Encapsulating Nanosphere: Apoferritin-doxorubicin Complex. *J Biomed Nanotechnol.* 2012, 8:508–514.
- Klener P: Základy klinické onkologie (Galén, 2011).
- Luu TH, Morgan RJ, Leong L, Lim D, McNamara M, Portnow J, Frankel P, Smith DD, Doroshow JH, Wong C, Aparicio A, Gandara DR, Somlo G: A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study. *Clin Cancer Res.* 2008, 14:7138–7142.
- Marks PA, Dokmanovic M: Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005, 14:1497–1511.
- Marnett LJ, Riggins JN, West JD: Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Investig.* 2003, 111:583-593.
- Mendes-Jorge L, Ramos D, Valença A, López-Luppo M, Pires VM, Catita J, Nacher V, Navarro M, Carretero A, Rodriguez-Baeza A, Ruberte J: L-ferritin binding to scara5: a new iron traffic pathway potentially implicated in retinopathy. *PLoS One.* 2014, 9:e106974.
- Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, Hoffmann K, Kotchetkov R, Busse R, Nau H, Cinatl J Jr: Valproic acid inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Mol Pharmacol.* 2004, 65:520-527.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004, 56:185-229.
- Mishra B, Patel BB, Tiwari S: Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine.* 2010, 6:9–24.
- Neubert RHH: Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011, 77:1–2.
- Ohashi M, Sugikawa E, Nakanishi N: Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Jpn J Cancer Res.* 1995, 86:819-827.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS: Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem.* 2001, 276:36734-36741.
- Pitot HC: The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer.* 1993, 72:962-970.
- Procházka P, Libra A, Zemanová Z, Hřebačková J, Poljaková J, Hraběta J, Bunčeka M, Stiborová M, Eckschlager T: Mechanisms of ellipticine-mediated resistance in UKF-NB-4 neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 2012, 103: 334-341.
- Reddy MV, Randerath K: Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis.* 1986, 7:1543–1551.
- Rosato RR, Grant S: Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004, 13:21–38.
- Schmeiser HH, Stiborova M, Arlt VM: ³²P-postlabeling analysis of DNA adducts. *Methods Mol Biol.* 2013, 1044: 389–401.
- Schwaller MA, Allard B, Lescot E, Moreau F: Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria. *J Biol Chem.* 1995, 270:22709-22713.

Stiborová M, Bieler CA, Wiessler M, Frei E: The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochem Pharmacol.* 2001, 62:1675-1684.

Stiborova M, Breuer A, Aimova D, Stiborova-Rupertova M, Wiessler M, Frei E: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by ³²P-postlabeling. *Int J Cancer.* 2003, 107:885–890.

Stiborová M, Sejbal J, Borek-Dohalská L, Aimová D, Poljaková J, Forsterová K, Rupertová M, Wiesner J, Hudecek J, Wiessler M, Frei E: The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N2-oxide. *Cancer Res.* 2004, 64:8374–8380.

Stiborova M, Rupertova M, Schmeiser HH, Frei E: Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006, 150:13-23.

Stiborová M, Poljaková J, Ryslavá H, Dracínský M, Eckschlager T, Frei E: Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *Int J Cancer.* 2007, 120:243–251.

Stiborová M, Rupertová M, Aimová D, Ryslavá H, Frei E: Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats. *Toxicology.* 2007, 236:50–60.

Stiborová M, Arlt VM, Henderson CJ, Wolf CR, Kotrbová V, Moserová M, Hudecek J, Phillips DH, Frei E: Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008, 226:318-327.

Stiborová M, Rupertová M, Frei E: Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1814:175-185.

Stiborova M, Manhartova Z, Hodek P, Adam V, Kizek R, Eckschlager T, Frei E: Cytotoxicity of and DNA adduct formation by ellipticine and its micellar form in human leukemia cells *in vitro*. *Neuro Endocrinol Lett.* 2015, 36:22-28.

Terbach N, Williams RS: Structure–function studies for the panacea, valproic acid. *Biochem Soc Trans.* 2009, 37:1126–1132.

Seznam publikací / List of publications

I. Papers

1. Dráb T, Kračmerová J, Hanzlíková E, **Černá T**, Litvácová R, Pohlová A, Tichá M, Liberda J: The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, 443:987-990. **IF₂₀₁₄ = 2,297.**
2. Hrabeta J, Groh T, Khalil MA, Poljakova J, Adam V, Kizek R, Uhlik J, Doktorova H, **Cerna T**, Frei E, Stiborova M and Eckschlager T: Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells. *Int J Oncol.* 2015, 47:971-980. **IF₂₀₁₅ = 3,018.**
3. Sulc M, Mrizova I, **Cerna T**, Frei E, Eckschlager T, Adam V, Kopeckova K, Stiborova M: Effectiveness of human cytochrome P450 3A4 present in liposomal nad microsomal nanoparticles in formation of covalent DNA adducts by ellipticine. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016, 37:95-102. **IF₂₀₁₆ = 0,918.**
4. Dostalova S, **Cerna T**, Hynek D, Koudelkova Z, Vaculovic T, Kopel P, Hrabeta J, Heger Z, Vaculovicova M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V: Site-Directed Conjugation of Antibodies to Apoferritin Nanocarrier for Targeted Drug Delivery to Prostate Cancer Cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016, 8:14430-14441. **IF₂₀₁₆ = 7,504.**
5. **Cerna T**, Hrabeta J, Eckschlager T, Frei E, Schmeiser HH, Arlt VM, Stiborová M: The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Exerts a Synergistic Cytotoxicity with the DNA-Damaging Drug Ellipticine in Neuroblastoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2018, 19:164. **IF₂₀₁₇ = 3,226.**
6. Indra R, **Černá T**, Heger Z, Hraběta J, Wilhelm M, Dostálová S, Lengálová A, Martínková M, Adam V, Eckschlager T, Schmeiser HH, Arlt VM, Stiborová M: Ellipticine-Loaded Apoferritin Nanocarrier Retains DNA Adduct-Based Cytochrome P450-Facilitated Toxicity in Neuroblastoma Cells. Rukopis připraven k odeslání k publikaci.

II. Conferences

1. Poljaková J, **Černá T**, Drčínská H, Eckschlager T, Stiborová M: Relationship between expression of genes participating in cancer development in neuroblastoma cells and their resistance to ellipticine, doxorubicin and cisplatin. Sborník abstraktů. XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno 11. – 12. 11. 2014, s. 57 (2014).
2. **Černá T**, Hraběta J, Groh T, Nguyen HV, Moulick A, Eckschlager T, Stiborová M: Multi-walled carbon nanotubes as a promising doxorubicin nanocarrier and their effects on neuroblastoma cell lines. X. Diagnostic, predictive and experimental oncology days. Olomouc, December 02 – 03, A41 (2014).

3. Hraběta J, Groh T, Khalil MA, Poljakova J, Adam V, Kizek R, Doktorova H, **Cerna T**, Frei E, Stiborova M, Eckschlager T: Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes drug resistance in neuroblastoma cells. Book of Abstracts. XV. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists. Brno 26. – 27. 5. 2015, pp. 82 – 85 (2015).
4. **Černá T**, Hraběta J, Groh T, Dostálová S, Bguyen HV, Moulick A, Kizek R, Adam V, Eckschlager T, Stiborová M: Nanocarriers with encapsulated doxorubicin and their effects on cancer cell lines. Sborník abstraktů příspěvků 20. Mezioborové česko-slovenské toxikologické konference TOXCON, Brno 27.5. – 29.5. 2015, s. 40 (2015).
5. Belhajová M, Hraběta J, Eckschlager T, **Černá T**, Stiborová M: V-ATPase in resistance to cytostatics and its inhibition, Program abstracts V4 International Conference Analytical Cytometry VIII, Olomouc 3. - 6. 10. 2015, s. 124 (2015).
6. Boleslavská B, Hraběta J, **Černá T**, Stiborová M, Vícha A, Eckschlager T: Histone posttranslational modifications and their significance in tumor resistance, Program abstracts V4 International Conference Analytical Cytometry VIII, Olomouc 3. - 6. 10. 2015, s. 126 (2015).
7. **Černá T**, Hraběta J, Dostálová S, Kizek R, Adam V, Eckschlager T, Stiborová M: Doxorubicin loaded apoferritin and its effect on cell lines, Program abstracts V4 International Conference Analytical Cytometry VIII, Olomouc 3. - 6. 10. 2015, s. 127 (2015).
8. **Černá T**, Hraběta J, Dostálová S, Kizek R, Adam V, Eckschlager T, Stiborová M: Doxorubicin loaded apoferritin and its effect on cancer and healthy cell lines. XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. Sborník příspěvků. Brno 10. – 11. 11. 2015, s. 62 (2015).
9. Plch J, Boleslavská B, **Černá T**, Hraběta J, Vícha A, Eckschlager T: Význam posttranslačních modifikací histonů v nádorové rezistenci. Sborník příspěvků. Praha 20. – 21. 4. 2016, s. 73 (2016).
10. **Černá T**, Hraběta J, Eckschlager T, Stiborová M: The synergistic effects of DNA-damaging drug ellipticine with a histone deacetylase inhibitor valproate in neuroblastoma cells. *Interdisc Toxicol.* 9:22-23 (2016).
11. Belhajová M, Hraběta J, **Černá T**, Eckschlager T, Stiborová M: A role of vacuolar-ATPase in resistance of neuroblastoma cells to doxorubicin, ellipticine and cisplatin. XXV. Biochemický sjezd. Sborník přednášek a posterů, program. Praha, 13. – 16. 9. 2016, s. 139 (2016).
12. Boleslavská B, Plch J, Hraběta J, **Černá T**, Stiborová M, Vícha A, Eckschlager T: Posttranslational modifications of histones can modulate vincristine-mediated resistance of neuroblastoma cells. XXV. Biochemický sjezd. Sborník přednášek a posterů, program. Praha, 13. – 16. 9. 2016, s. 145 (2016).

13. **Černá T**, Hraběta J, Eckschlager T, Stiborová M: Histone deacetylase inhibitor valproic acid synergizes cytostatic effects of anticancer agent ellipticine in neuroblastoma cell lines. XXV. Biochemický sjezd. Sborník přednášek a posterů, program. Praha, 13. – 16. 9. 2016, s. 155 (2016).
14. Lengálová A, Indra R, **Černá T**, Dostálová S, Heger Z, Kizek R, Frei E, Eckschlager T, Adam V, Stiborová M: Study on the release of an anticancer drug ellipticine from its multi-walled carbon nanotube forms and its capability of generating the covalent DNA adducts in vitro. XXV. Biochemický sjezd. Sborník přednášek a posterů, program. Praha, 13. – 16. 9. 2016, s. 210 (2016).
15. **Černá T**, Hraběta J, Dostálová S, Adam V, Eckschlager T, Stiborová M: The prostate cancer-targeted and nontargeted apoferritin loaded by doxorubicin and its effect on cancer and healthy cell lines. XII. Diagnostic, predictive and experimental oncology days. Sborník příspěvků. Olomouc, 30. 11. - 1. 12. 2016, s. 25 (2016).
16. **Černá T**, Indra R, Dostálová S, Heger Z, Adam V, Hraběta J, Eckschlager T, Stiborová M: Ellipticine and doxorubicin encapsulated in apoferritin nanoparticles and their effects on neuroblastoma cell lines. *Interdisc Toxicol.* 10:21 (2017).
17. Indra R, Wilhelm M, **Černá T**, Heger Z, Dostálová S, Adam V, Eckschlager T, Stiborová M: Apoferritin nanocarrier with encapsulated ellipticin – its construction and properties. *Interdisc Toxicol.* 10:24 (2017).
18. **Černá T**, Hraběta J, Eckschlager T, Stiborová M: The synergistic effects of DNA-damaging drug ellipticine with histone deacetylase inhibitor valproate on cytotoxicity in neuroblastoma. XXIX. Xenobiochemické symposium. Slovník příspěvků. Telč, 23. – 26. 5. 2017, s. 31 (2017).
19. Stiborová M, Indra R, Wilhelm M, **Černá T**, Eckschlager T, Heger Z, Dostálová S, Schmeisser HH, Arlt VM, Adam V: Construction of an apoferritin nanocarrier bearing an anticancer agent ellipticine and study of their properties. XXIX. Xenobiochemické symposium. Sborník příspěvků. Telč, 23. – 26. 5. 2017, s. 46 (2017).
20. Indra R, Wilhelm M, **Černá T**, Heger Z, Dostálová S, Adam V, Eckschlager T, Stiborová M: Formulation of apoferritin nanocarrier with encapsulated ellipticine and study of its properties. *Interdisc Toxicol.* 11:66 (2018).
21. **Černá T**, Hraběta J, Indra R, Heger Z, Adam V, Eckschlager T, Stiborová M: Apoferritin nanocage for ellipticine delivery to neuroblastoma cells. *Interdisc Toxicol.* 11:67 (2018).