

Abstrakt

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

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

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