

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská Fakulta v Hradci Králové**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Kamil Rudolf

2010

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská Fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program
Lékařská biologie

*Mechanismy indukce buněčné smrti v modelu lidského
maligního melanomu in vitro*

*The mechanisms of cell death induction in human
malignant melanoma in vitro*

MUDr. PharmDr. Kamil Rudolf

Školitel: prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.

Školitel konzultant: Doc. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.

Hradec Králové, 21.8. 2010

Obhajoba dne:
(doplň studijní odd.)

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 21.8. 2010

Děkuji prof. MUDr. RNDr. Miroslavu Červinkovi, CSc. a Doc. PharmDr. Emilu Rudolfovi, Ph.D. za odborné vedení, praktické rady a pomoc při práci na konečném sestavení dizertační práce a v neposlední řadě za poskytnutí testovacího materiálu a umožnění provést experimentální část práce v prostorech výzkumné laboratoře.

SEZNAM ZKRATEK

APAF-1	apoptickou proteázu aktivující faktor 1
BCNU	karmustin
BRAF	V-raf myši sarkomový homolog virového onkogenu B1
BrdU	bromo-deoxyuridin
DMEM	Dulbekovo modifikované Eaglovo médium
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FAMMM	familiální atypická mnohočetná mateřská znaménka a melanom (familial atypical multiple mole and melanoma)
FBS	fetální bovinní sérum
HMB	lidský černý melanom (human melanoma black)
CHK1	check point kináza 1
JNK	c-jun N-terminální kináza
MEK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza
MITF	s mikrooftalmií asociovaný transkripční faktor
MMP	transmembránový mitochondriální potenciál
NAC	N-acetyl cystein
NHL	non-Hodgkinovy lymfomy
(PI(3)K)	fosfatidylinositol-3-kináza
TNM	systém klasifikace zhoubných nádorů (T - rozsah primárního nádoru, N - přítomnost či nepřítomnost a rozsah metastáz v regionálních mízních uzlinách, M - přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
WST	5-(2,4-disulfonatofenyl)-3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium
XIAP	X-vázaný inhibitor apoptotického proteinu

1. ÚVOD	3
2. TEORETICKÁ ČÁST	5
2.1. ZHOUBNÉ NÁDORY KŮŽE S VÝJIMKOU MELANOMU	5
2.2. MALIGNÍ MELANOM (MELANOBLASTOM)	8
2.2.1. <i>Formy maligního melanomu</i>	9
2.2.2. <i>Diagnostika a staging</i>	10
2.2.3. <i>Terapeutické možnosti</i>	11
2.2.4. <i>Chemoterapie</i>	12
2.3. BIOLOGIE MELANOMU	13
2.3.1. <i>Signální dráha mitogeny aktivovaných proteinových kináz (Ras/Raf/MEK/ERK)</i> 13	
2.3.2. <i>Signální dráha Ras-ERK a fosfatidylinositol-3-kinázy</i>	14
2.3.3. <i>Signalizace Mitf</i>	14
2.3.4. <i>Signální dráha Wnt/β-katenin</i>	15
2.3.5. <i>Signální dráha buněčné smrti - apoptózy</i>	16
2.3.6. <i>Ostatní signální dráhy a molekuly</i>	18
2.4. TOPOISOMERÁZY A JEJICH ROLE V BUŇCE	18
2.5. INHIBITORY TOPOISOMERÁZ	19
3. CÍLE PRÁCE	23
4. METODIKY	24
4.1. CHEMIKÁLIE A REAGENCIE	24
4.2. BUNĚČNÉ KULTURY – CHARAKTERIZACE	25
4.3. BUNĚČNÉ KULTURY – KULTIVACE	25
4.4. OVLIVNĚNÍ BUNĚK	25
4.5. TEST BUNĚČNÉ PROLIFERACE MĚŘENÍM AKTIVITY MITOCHONDRIÁLNÍCH ENZYMŮ (WST-1) A STANOVENÍM MNOŽSTVÍ PROTEINŮ V BUŇKÁCH (COOMASSIE BRILLIANT BLUE)	26
4.6. TEST BUNĚČNÉ PROLIFERACE MĚŘENÍM DNA SYNTÉZY	26
4.7. TEST POŠKOZENÍ DNA: VARIANTA – MIKROFLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ HISTONU H2A.X	27
4.8. TEST POŠKOZENÍ DNA: VARIANTA – COMET ASSAY (ALKALI SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS)	27
4.9. ELISA STANOVENÍ EXPRESE CHK1	28
4.10. STANOVENÍ OXIDATIVNÍHO STRESU	28
4.11. MĚŘENÍ HLADIN SUPEROXIDŮ	28
4.12. TEST AKTIVITY P38 A JNK	28
4.13. MITOCHONDRIE: ZOBRAZOVÁNÍ V ŽIVÝCH BUŇKÁCH A ANALÝZA MITOCHONDRIÁLNÍHO TRANSMEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU	29
4.14. URČENÍ OBSAHU ATP.....	29
4.15. PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH LYZÁTŮ	29
4.16. WESTERN BLOTTING.....	30
4.17. EXPRESE PROTEINŮ BAX, BCL-2, BCL-XL, MCL-1, PUMA A NOXA STANOVENÁ POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE	31
4.18. POTLAČENÍ EXPRESE (KNOCKDOWN) GENU BAX	31
4.19. DETEKCE APOPTÓZY	31
4.19.1. <i>Průtoková cytometrie</i>	31
4.19.2. <i>Aktivita kaspáz</i>	31
4.19.3. <i>Test uvolnění cytochromu c</i>	32

4.19.4 Imunofluorescenční detekce štěpení PARPu a analýza obrazu	32
4.20. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ	33
5. VÝSLEDKY	34
5.1. EXPRESE TOPOISOMERÁZY I A TOPOISOMERÁZY IIa U MODELOVÝCH MELANOMOVÝCH LINÍ.....	34
5.2. CYTOTOXICITA A PROAPOPTOTICKÁ AKTIVITA KAMPTOTECINU NA MELANOMOVÝCH BUŇKÁCH	34
5.3. KAMPTOTECINEM VYVOLANÉ POŠKOZENÍ DNA A AKTIVACE SIGNÁLNÍCH DRAH U MELANOMOVÝCH BUNĚK.....	37
5.4. VLIV KAMPTOTECINU NA EXPRESI PROTEINŮ RODINY BCL-2 MELANOMOVÝCH BUNĚK.	42
5.5. VLIV KAMPTOTECINU NA MITOCHONDRIE MELANOMOVÝCH BUNĚK	45
5.6. CYTOTOXICITA A PROAPOPTOTICKÁ AKTIVITA ETOPOSIDU NA MELANOMOVÝCH BUŇKÁCH	46
5.7. ETOPOSIDEM VYVOLANÉ POŠKOZENÍ DNA A AKTIVACE NA p53 ZÁVISLÉ SIGNÁLNÍ DRÁHY U MELANOMOVÝCH BUNĚK	49
5.8. PŘÍMÝ VLIV ETOPOSIDU NA MITOCHONDRIE MELANOMOVÝCH BUNĚK	50
5.9. ETOPOSID INDUKUJE NA KASPÁZÁCH ZÁVISLOU MITOCHONDRIÁLNÍ APOPTÓZU	53
5.10. CYTOTOXICITA A PROAPOPTOTICKÁ AKTIVITA KAMPTOTECINU, ETOPOSIDU A JEJICH KOMBINACE NA MELANOMOVÝCH BUŇKÁCH S ODLIŠNÝM STATUTEM GENU TP53	57
5.11. POŠKOZENÍ DNA A OXIDATIVNÍ STRES INDUKOVANÝ KOMBINACÍ KAMPTOTECINU A ETOPOSIDU NA MELANOMOVÝCH BUŇKÁCH S ODLIŠNÝM STATUTEM GENU TP53	60
5.12. KOMBINACE INHIBITORŮ TOPOIZOMERÁZY STIMULUJE ZMĚNY V AKTIVITĚ STRESOVÝCH KINÁZ	61
5.13. KOMBINACE INHIBITORŮ TOPOIZOMERÁZY AKTIVUJE MITOCHONDRIÁLNÍ A NA KASPÁZE ZÁVISLOU APOPTÓZU	63
5.14. KOMBINACE INHIBITORŮ TOPOIZOMERÁZY AKTIVUJE PRO BUNĚČNOU LINII SPECIFICKOU PROAPOPTOTICKOU SIGNALIZACI.....	66
6. DISKUSE	67
7. ZÁVĚRY	75
8. SEZNAM LITERATURY	77

1. ÚVOD

Zhoubná nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí člověka. Jejich negativní působení zaznamenáváme především v rozvinutých zemích, a to i přesto, že se zde neustále zlepšují životní podmínky a zdravotní péče. V České republice je až u třetiny populace nádorové onemocnění diagnostikováno, přičemž přibližně čtvrtina populace také na tato onemocnění umírá (42).

Nádorové onemocnění vzniká na základě série poruch v jedné či mnoha buňkách, které se vymknou kontrole a jejímž následkem je nekontrolovatelný růst a dělení buněčných populací. Podstatou ztráty kontroly (deregulace) buněčné proliferace je změna genetické informace, neboli mutace DNA. Mutace jsou vyvolány působením řady vnitřních a zevních faktorů, a to fyzikální (vysokoenergetické, především ionizující záření), chemické (mutageny a karcinogeny), biologické (některé viry a helminti) a hormonální (dlouhodobě působící hormonální stimulace) povahy. Rozvoj molekulární biologie a buněčné genetiky odhalil existenci specifických genů, které jsou v případě mutace DNA odpovědné za vlastní proces nádorové přeměny. Rozlišujeme skupinu protoonkogenů, skupinu tumor supresorových genů a skupinu tzv. mutátorových genů. Hlavní funkcí protoonkogenů je stimulace růstu, v případě jejich mutace dochází ke zvýšené aktivitě těchto genů a následně buněčné proliferaci nezávisle od fyziologických růstových faktorů. Mezi protoonkogeny zařazujeme růstové faktory, tyrosinkinázové receptory, nereceptorové tyrosinkinázy, receptory spřažené s G proteiny, membránové G proteiny včetně malých GTPáz, serin/threonin kinázy, transkripční faktory a jiné proteiny vázající se na DNA. Hlavní funkcí tumor supresorových genů (antionkogenů) je útlum buněčného růstu, v případě mutace je vlastní gen neaktivní a následná převaha protoonkogenů vede k promoci buněčné proliferace. Nejznámějším antionkogenem je tp53. Hlavní funkcí mutátorových genů je oprava poškozené DNA, v případě mutace je vlastní gen neaktivní a daný stav může přejít v nekontrolovatelný buněčný růst.

Základní charakteristiky nádorových buněk představují hyperplazie (nekontrolovaná proliferace buněk), anaplázie (ztráta buněčné funkce), invazivita (prorůstání nádoru do zdravých tkání) a metastazování (šíření nádorových buněk z primárního ložiska do celého organismu) (45). Nádor se projevuje jednak komplikacemi v místě svého primárního růstu, a to např. útlakem okolní tkáně, bolestivostí, krvácením nebo poruchou funkce orgánu, jednak celkovými projevy na úrovni organismu, jako např. nechutenstvím, úbytkem hmotnosti,

únavou a nočními poty. Mnohé pro daný typ nádoru charakteristické znaky jsou dány lokalizací.

Kožní povrch představuje v průměru plochu 1,5 až 2 m² a jeho hmotnost odpovídá zhruba jedné pětině tělesné hmotnosti, což je u dospělého člověka přibližně 15 kg. Kůže je tedy největším orgánem lidského těla. Její skladba umožňuje vykonávat ochrannou funkci kůže jako orgánu na rozhraní mezi organizmem a zevním prostředím **(39)**. Vzhledem ke své velikosti a přímé exponenci faktorům zevního prostředí není překvapením celkové množství a rozmanitost kožních onemocnění, včetně častého výskytu novotvarů. Kožní nádory představují až třetinu všech zaznamenaných maligních onemocnění.

Maligní melanom je hlavní příčinou úmrtí na kožní onemocnění. Patří mezi nejagresivnější lidské nádory, jejichž incidence v kavkazské (bílé) populaci neustále stoupá **(19)**. V České republice je zaznamenán relativně vysoký nárůst počtu případů v posledních 25 letech. Ve srovnání s rokem 1970 se počet hlášených nových onemocnění v roce 2002 zvýšil pětkrát u mužů (v roce 1970 to bylo 151 hlášených nových onemocnění a v roce 2002 již 758). Stejná situace panuje u žen, kde se počet hlášených nových onemocnění zvýšil také téměř pětkrát (ze 165 na 803 v roce 2002). V přepočtu na 100 000 obyvatel to představuje 15,3 hlášených nových onemocnění u mužů i žen **(43)**. Celoživotní pravděpodobnost diagnózy zhoubného melanomu je u mužů 1,91 %, u žen 1,31 % **(77)**. Průměrný věk postižených melanomem se v posledních letech snižuje. Z těchto důvodů jsou prevence a léčba maligního melanomu považovány mnoha vyspělými státy světa za prioritní úkol veřejného zdravotnictví **(30)**.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Kožní nádory představují přibližně polovinu všech nádorů postihujících populaci. Vyskytují se nejvíce ve středním a vyšším věku. Vedle primárních nádorů se vzácně vyskytují také metastatické nádory, které mohou být prvním příznakem základního onemocnění. Klinický obraz nádorů kůže je velice pestrý. Klinická diagnóza může být v řadě případů obtížná, někdy i nemožná. Základem diagnózy je histologické vyšetření. Na možnost nádoru upozorňují nezánnětlivé, tuhé papuly, uzlíky nebo hrboly, dále nehojící se eroze nebo vředy, které jsou často pokryté recidivující krustou, křehké útvary podobné granulacím, spontánně nebo na dotek krvácející, absence subjektivních příznaků a neúspěšná zevní léčba. Biologické vlastnosti nádorů se pohybují od úplně neškodných až k vysoce zhoubným, nicméně přesná hranice vymezena není. Za benigní nádor můžeme považovat ohraničený, pomalu rostoucí nebo se neměnicí projev beze sklonu ke krvácení a rozpadu, pohyblivý proti spodině a okolí. Maligní nádor se naopak rychle zvětšuje, krvácí a často ulceruje (9). Mezi maligní novotvary kůže zařazujeme nádory epitelového původu (karcinomy), nádory mezenchymového původu (sarkomy), maligní lymfomy, metastázy jiných solidních tumorů a maligní melanom. Nejvíce agresivní a život ohrožující jsou maligní melanom, metastazující spinaliom a maligní kožní lymfomy.

2.1. Zhoubné nádory kůže s výjimkou melanomu

1) Epitelové kožní nádory (karcinomy). Jsou to nejčastěji se vyskytující maligní novotvary kůže. Často vznikají na podkladě různých kožních prekanceróz, představovaných zejména keratózami (aktinická, radiační a termální keratóza). Mezi mutageně působící faktory patří ultrafialové záření ve spektru B (UVB), ionizující záření a infekce papiloma viry. Hlavní úlohu v rozvoji maligní transformace zastává mutace genu p53, která vede k inhibici apoptózy keratinocytů a jejich klonální expanzi. S geneticky podmíněnou náchylností ke vzniku kožních karcinomů se setkáváme např. u nemocných s xeroderma pigmentosum. Povrchová lokalizace nádorů a neagresivní charakter růstu umožňují včasnou diagnózu a rychlé zahájení léčby, proto je procento vyléčitelnosti vysoké (cca 95 %) (115).

a) Spinoocelulární karcinom (spaliom). Je to maligní nádor původem z keratinocytů. Vzniká intraepiteliálně, především na podkladě aktinické keratózy a přechází v invazivně až destruktivně rostoucí nádor s tendencí k zakládání metastáz. Metastázy se šíří hlavně lymfatickou cestou. Incidence spaliomu je přibližně 10 případů na 100000 obyvatel. Vedle

UV záření působí kancerogenně také polycyklické uhlovodíky a arzen. Rizikovým faktorem vzniku je rovněž anamnéza v minulosti poškozené kůže, např. v případě bércových vředů (i zhojených), jizev po spáleninách apod. Klinický obraz je velmi různorodý, neboť úzce souvisí s pokročilostí nádoru. Rozlišujeme difuzně infiltrující formu, ulcerózní formu a exofytickou formu nádoru. Výskyt spinaliomu je častý na světlu vystavených místech, tedy na hlavě (obličej, ušní boltce a pleš), předloktí, hřbetu rukou. Méně často se s ním setkáváme na slizničních přechodech, v oblasti vulvy, penisu a anální krajiny. Diagnóza je určena na základě histologického vyšetření po excizi ložiska s dostatečným lemem zdravé tkáně. Fyzikálně vyšetřujeme spádové uzliny k vyloučení metastáz. Terapie zahrnuje chirurgickou léčbu jako metodu volby, dále cílenou radioterapii urychlenými elektrony a lokální chemoterapii (5-fluorouracil v masťovém základu). V případě metastazujícího tumoru je nutno použít kombinované celkové chemoterapie (cisplatina, bleomycin, adriamycin).

b) Bazocelulární karcinom (bazaliom). Je to maligní nádor z bazálních buněk epidermis a z terminálního vlasového folikulu. Představuje nejčastější karcinom kůže u starších lidí. Nacházíme ho především na místech chronicky exponovaných slunečnímu záření (kůže obličeje a předloktí). Roste pomalu infiltrativně s postupnou destrukcí okolní tkáně. Riziko metastáz je zanedbatelné, ale u nádorů větších rozměrů se často setkáváme s recidivami. Klinický obraz je různorodý, rozlišujeme několik nádorových typů. Uzlovitá forma tvoří různě veliké hladké hrboły s teleangiektaziemi. Jizvící forma je vkleslá, leskle bledá, jen na okraji navalitá. Ulcerózní forma je zprvu tvořena hrbolem, který se později centrálně rozpadá (ulcus rodens). Vegetující forma má křehké mokvající a krvácející granulace. Pigmentová forma může imitovat melanom. Sklerodenní forma má bělavý lesklý povrch, palpačně tuhý, bez kožního reliéfu. Povrchová forma je v úrovni okolní kůže, tvoří ji nepravidelná červenohnědá ložiska s plochým perličkovým lemem (9). Diagnóza se opírá o histologické vyšetření, terapie zahrnuje chirurgickou léčbu jako metodu volby. Alternativně je možné použití kryoterapie, případně tzv. chemochirurgie (fixace ložiska pastou chloridu zinečnatého s operativním odstraněním tumoru po 24 hodinách).

c) Bowenův karcinom (Bowenova dermatóza). Je to maligní intraepidermální nádor (karcinom in situ), který svou lokalizací a klinickým obrazem připomíná psoriázu (lupénku). Jeho neobvyklou formou je Queyratova erytroplazie postihující glans (žalud) penisu. V anogenitálních lézích se často zjišťuje virus HPV (většinou typ 16 a 18). Až cca 20% případů Bowenovy dermatózy přechází v maligní spinocelulární karcinom, který prorůstá do hlubších struktur kůže a má metastatický potenciál. Diagnóza je určena na základě

histologického vyšetření, terapie zahrnuje ozáření rentgenem, kryoterapii, nebo imunochemoterapii (izotretinoin, případně jeho kombinace s interferonem α).

d) Pagetův karcinom (Pagetova nemoc). Je to maligní epidermotropní nádor vývodu mléčné žlázy nebo vývodů apokrinních žláz (extramamární forma). Nejčastěji se manifestuje jednostrannou ekzematózní nebo erozivní lézí na prsní bradavce a areole. Postupně dochází k vtahování bradavky, pod kterou je možné nahmatat tuhý infiltrát. Tato léze je téměř ve všech případech spojena s intraduktálním karcinomem prsu. Diagnóza je určena na základě histologického vyšetření, terapie zahrnuje chirurgickou léčbu s adjuvantní radioterapií.

e) Karcinomy z kožních adnex. Postiženy jsou hlavně potní a mazové žlázy. Celkově patří mezi velmi vzácné nádory, jejichž diagnóza je určena na základě histologického vyšetření. Terapie zahrnuje chirurgické odstranění nádoru.

2) Maligní mezenchymové nádory. V klinické praxi se nejčastěji jedná o fibrosarkom, který často a záhy metastazuje hematogenní cestou. Terapie nádoru je chirurgická. V souvislosti s celosvětovým nárůstem onemocnění získané imunodeficiencie (AIDS) se můžeme setkat s Kaposiho sarkomem. Kaposiho sarkom je nádorové onemocnění endotelu a hladké svaloviny cév kůže dolních končetin způsobené lidským herpesvirem HHV-8. Za normálních okolností je imunitní systém organismu schopen virovou nákazu potlačit, a proto se nemoc projevuje až při závažné poruše imunity. Jeho výskyt je diagnostickým znakem selhávání imunitního systému. V případě syndromu získané imunodeficiencie nabývá onemocnění invazivní formy se sklonem ke generalizaci (lymfatické uzliny, trávicí ústrojí, perikard, dýchací systém). Prognóza je infaustní, léčebné metody zahrnují radioterapii, při diseminaci nemoci systémovou chemoterapii, případně podávání interferonu.

3) Maligní kožní lymfomy (1). Představují izolované postižení kůže bez prokazatelného postižení jiných orgánů a tkání. Vedle lymfomů zažívacího traktu představují druhou nejčastější extranodální lokalizaci lymfomu. Rozlišujeme primární (vznikající v kůži) a sekundární (postižení kůže v rámci diseminace NHL) kožní lymfomy.

a) Kožní T-lymfomy. Nejčastějším primárním kožním lymfomem je Mycosis fungoides, nízce agresivní a zároveň nízce maligní T-lymfom, který vychází z pomocných T lymfocytů (helper – T_H). Onemocnění probíhá v několika stádiích, přičemž počáteční premykotická stádia probíhají indolentně. Postupně ale dochází k infiltraci kůže, tvorbě polokulovitých nádorů a vředových lézí. Poslední stadium je pravděpodobně výrazem přeměny relativně benigního procesu na maligní lymfom s vysokým stupněm malignity.

V této fázi již dochází k postižení vnitřních orgánů. Zvláštní formou je mycosis fungoides d'emblee, začínající přímo tvorbou nádorů a mající maligní průběh. Leukemickou formu onemocnění s erythrodermií, generalizovanou lymfadenopatií a hepatosplenomegalií představuje Sézaryho syndrom. Diagnóza nemoci se stanoví na základě histologického a imunohistologického vyšetření probatorní kožní excize. Terapie závisí na stadiu nemoci, v počátečním období postačuje léčba lokální v podobě aplikace glukokortikoidů a antipruriginóz. Později se osvědčila PUVA, čili fotochemoterapie (ozáření postižené kůže UV světlem vlnové délky 320 – 400 nm, které provádíme za 2 hodiny po předchozím podání 9-metoxypsoralenu), radioterapie a lokální aplikace retinoidů. Pokročilá stadia nemoci léčíme systémovou chemoterapií, včetně podávání protilátky antiCD52 (alemtuzumab), případně extrakorporální fototerapií (fotoforézou).

b) Kožní B-lymfomy. Tvoří raritní skupinu onemocnění, kde rozlišujeme primární kožní folikulární lymfomy a primární kožní velkobuněčné B-lymfomy. Nejhorší prognózu mají primární kožní velkobuněčné B-lymfomy dolní končetiny, které často relabují (1). Léčba spočívá v případě kožní lokalizace v radioterapii a chirurgickém výkonu, v případě diseminace nemoci v systémové chemoterapii.

4) Sekundární nádory kůže (metastázy do kůže). Do kůže mohou metastazovat prakticky všechny maligní tumory. Nejčastěji se ale jedná o karcinom prsu, adenokarcinom ledviny (Grawitzův tumor) a maligní melanom. Určení primárního nádoru je pro velmi různorodý vzhled metastáz a obtížné histologické hodnocení zdlouhavé. Terapie spočívá v léčbě primárního ložiska spolu s chirurgickým odstraněním kožní metastázy.

2.2. Maligní melanom (melanoblastom)

Maligní melanom vzniká neoplastickou proliferací pigmentotvorných buněk organismu. Neuroektodermální původ melanocytů vysvětluje výskyt nádoru v různých tkáních. Vedle kožní lokalizace se proto vzácně můžeme setkat také s postižením oka a sliznic. V protikladu k ostatním nádorům kůže, jako je bazaliom nebo spaliom, se melanom vyznačuje nebezpečím časného hematogenního, případně lymfogenního metastázování. Přibližně 30-70 % všech případů vzniká na podkladě pigmentového névu, zbytek se tvoří de novo na zdravé kůži.

Etiologie maligní transformace melanocytů není dosud plně objasněna. Nezpochybnitelnou roli má genetická dispozice jedince, když přibližně 5-10 % melanomů se

vyskytuje v rodinách s genetickou zátěží pro xeroderma pigmentosum (25). Zvýšený výskyt melanomu je popisován také v případě syndromu dysplastických névů nebo FAMMM. Predispozicí jsou také velké kongenitální a mnohočetné dysplastické névy, snížená činnost imunitního systému a ultrafialové (UV) záření, které působí zejména v iniciální fázi nádorové přeměny. Na vzniku melanomu se přitom podílí zejména UV záření ve spektru B (vlnová délka 280-320 nm), které indukuje v kůži řadu patologických procesů (imunosupresivní účinek, vznik volných kyslíkových radikálů a poškození DNA melanocytů). Jako vysoce riziková je hodnocena expozice tomuto záření v dětském věku., přičemž největší riziko vzniku melanomu je spojeno s akutní solární dermatitidou (spálením kůže). Chronická expozice UV záření se podílí na vzniku pouze jednoho typu melanomu, a to lentigo maligna melanoma. Lidé s fototypem kůže I a II (pihy, ryšavé vlasy, modré oči) mají přitom nejvyšší pravděpodobnost vzniku kožního melanomu. Melanom roste ve dvou fázích: horizontálně-radiální, kdy se atypické melanocyty šíří epidermis za vzniku buněčných klonů s různou rychlostí růstu a tvorby pigmentu, a vertikální, kdy melanomové buňky pronikají do korie a zde se dále množí. Do vertikální fáze přejde v průběhu doby většina melanomů.

2.2.1. *Formy maligního melanomu*

a) Kožní formy melanomu. Na základě klinicko – histologického hodnocení rozeznáváme (54):

- Povrchově se šířící melanom „superficial spreading melanoma“ (SSM). Představuje cca 60 – 70 % všech tumorů. Má nejvyšší zastoupení v bílé populaci. Podíl UV záření na jeho vzniku je rozhodující. Vyskytuje se kdekoli na trupu, hlavě či končetinách. Obvyklou lokalizací jsou u mužských zástupců horní partie trupu a u ženských zástupců bérce a stehna. Prekurzorem nádoru může být dysplastický nebo junkční névus. Počáteční drobná a plochá skvrna postupně roste, nápadná bývá především změna pigmentace, nepravidelné okraje, svědění a někdy i drobné krvácení. Po určité době původně horizontální růst tumoru přechází v růst vertikální. Vzniká zánětlivý lem, v bezprostředním okolí nádoru se tvoří drobné uzlíky (noduly). V této době již nádor většinou metastazuje, a to nejdříve do podkoží mezi primární ložisko a regionální lymfatické uzliny, později do vzdálených lymfatických uzlin, kůže, mozku, plic a gastrointestinálního traktu (GIT) – zejména tenkého střeva.

- Lentigo maligna melanom (LMM). Vzniká na podkladě prekancerózy melanosis circumscripta praecancerosa Dubreilh (Hutchinsonova skvrna). Představuje 5 – 10 % všech tumorů. Nejčastěji se vyskytuje v oblasti hlavy a krku u starších lidí. Charakter růstu nádoru není agresivní, nebezpečí spočívá zejména v možnosti rychlé přeměny v invazivní formu maligního melanomu.
- Nodulární melanom (NMM). Představuje 15 – 25 % všech tumorů. Vyznačuje se velmi nepříznivou prognózou pro svůj okamžitý vertikální růst a brzké zakládání metastáz. Nebezpečná je zejména amelanotická varianta nádoru, pokládána mnohdy za onychomykózu.
- Akrolentiginózní melanom (ALM). Představuje zrádný typ melanomu, který je častým zdrojem diagnostických omylů pro svou neobvyklou lokalizaci (místa bez vlasových folikulů – subungválně, dlaně rukou, plosky nohou). Nádor časně metastazuje, proto je považován za nejrizikovější ze všech.

b) Slizniční formy melanomu. Vyskytují se raritně, tvoří necelé 1% všech melanomů. Na jejich vzniku se nepodílí UV záření. Charakteristickými lokalizacemi tohoto tumoru jsou dutina ústní, dutina nosní, paranazální dutiny, perianální a vaginální oblast. Pro svou pozdní diagnózu mají většinou velmi špatnou prognózu.

c) Okulární formy melanomu. Jedná se o nejčastější nitrooční nádory dospělých lidí. Podle původu rozlišujeme melanom cévnatky, melanom řasnatého tělesa a melanom duhovky. Diagnóza nádoru je naštěstí vzhledem k časným zrakovým obtížím pacienta zpravidla velmi rychlá. Terapie je chirurgická, dlouhodobá prognóza nejistá.

2.2.2. Diagnostika a staging

Základem diagnózy onemocnění je vždy klinické vyšetření. V tomto případě nejsou obvykle nutná speciální vyšetření, neboť se jedná o tumor plně vyšetřitelný zrakem a rozhodující je tak zejména klinická zkušenost. Pro vyslovení klinického podezření na kožní maligní melanom bylo stanoveno pravidlo **ABCDE**, které charakterizuje suspektní kožní nálezy na základě 5 ukazatelů. **A**symetrie znamená nepravidelný tvar nálezu, **b**orderline nepravidelné cípaté okraje se zářezy a výběžky, **c**olour znamená změnu barvy jako zčervenání, ztmavnutí, nepravidelné rozmístění pigmentu, **d**iameter je průměr ložiska nad 5 mm s trvalou tendencí ke zvětšování a **e**levace růst tumoru nad úroveň kůže. Čím větší množství ukazatelů je pozitivních, tím větší je pravděpodobnost, že se jedná o maligní melanom. Naneštěstí málokdy jsou splněna všechna kritéria, někdy dokonce neplatí žádné.

Suspektní léze by měla být vždy vyšetřena dermatoskopicky. Pro diagnózu je rozhodující histologické vyšetření doplněné o imunohistochemické barvení na monoklonální protilátku HMB 45 a protein S100 (40). Samozřejmostí je palpační vyšetření regionálních lymfatických uzlin, doplněné o ultrasonografii. Skryté uzliny ozřejmuje vedle ultrasonografie také počítačová tomografie, případně pozitronová emisní tomografie. Při diseminaci nádoru následuje podrobnější vyšetření s cílem nálezu vzdálených metastáz (54).

Staging nádoru se stanoví na základě kritérií klasifikace TNM (v současnosti platí šesté vydání TNM klasifikace z roku 2004). Raritou je stanovení kategorie T (velikost tumoru) až po odstranění primárního nádoru podle histopatologických kritérií, tedy pT (histopatologická šíře tumoru). Hodnocena je hloubka invaze tumoru podle histologických vrstev kůže zavedená Clarkem. Okulárním mikroskopem zjišťujeme tloušťku a šíři nádoru v milimetrech dle Breslowa. Výsledek je významným prognostickým faktorem. Nádory zasahující do hloubky vyšší než 4 mm patří mezi vysoce rizikové.

2.2.3. *Terapeutické možnosti*

a) Chirurgická léčba. V současnosti představuje jedinou kurativní léčebnou metodu v podobě excize ložiska s dostatečným lemlem okolní zdravé tkáně. Zárokem nesmí dojít k devastaci postižené oblasti. Podle tloušťky nádoru, kterou ale zjistíme až histologicky, jsou doporučeny různé šířky tzv. ochranných lemů. Protože klinicky můžeme tloušťku nádoru odhadnout pouze velmi nepřesně a potřebnou informaci získáme až po jeho vynětí, často je nutné ještě jednou podstoupit chirurgický výkon a následně rozšířit excizi o 0,5-2 cm z každé strany operačního řezu. Celá strategie ochranných lemů vychází z představy, že nádorové buňky nemusí být přítomny pouze v klinicky viditelném vlastním nádoru, ale mohou se samostatně nebo ve skupinkách vyskytovat v jeho těsném okolí (41). Chirurgická léčba zahrnuje také odstranění postižených regionálních lymfatických uzlin metodou disekce příslušné regionální oblasti. Velkým přínosem se stala sentinelová lymfadenektomie (sentinel node biopsy), která jako diagnostická operace slouží v rámci časně detekce mikrometastáz do spádové strážní uzliny u melanomů s nodularitou a při vertikální invazi tumoru nad 1,0 mm. Je – li strážní uzlina postižena, je vhodné odstranit také ostatní uzliny standardní disekcí. Velkým problémem uzlinové disekce je možnost vzniku lymfatického otoku postižené oblasti (zpravidla končetiny). Při absenci nádorových buněk je uzlinové postižení spádové oblasti nepravděpodobné. Kryochirurgie se uplatňuje pouze jako paliativní metoda při celkové progresi onemocnění v léčbě krvácejících kožních metastáz.

b) Radioterapie. Našla své uplatnění v léčbě pokročilých stadií nemoci, a to při ovlivnění symptomatických vzdálených metastáz. Při postižení měkkých tkání se s výhodou používá režim hypofrakcionace, případně lze použít ozáření rychlými elektrony. Své indikace má i paliativní a analgetická radioterapie.

c) Imunoterapie. Uplatňuje se především jako adjuvantní léčba nádoru po dobu 1-2 roků u rizikovějších pacientů ve stadiu IIb a III. Spočívá v podávání podkožních injekcí interferonu α . Intralezionální imunoterapií se označuje aplikace imunoterapeuticky působící látky (interferon α , interleukin 2) přímo do kožní nebo podkožní metastázy. V rámci klinických studií probíhají zkoušky řady vakcín (DNA vakcíny, anti – idiotypové vakcíny aj.), když hlavním cílem je stimulace imunitní odpovědi organismu na maligní melanom, kterému je přisuzována mezi nádory neobvykle vysoká imunogenita.

d) Hormonální léčba. V současnosti je stále předmětem klinického zkoušení. Nadějným se jeví především nález hormonálních receptorů na buňkách melanomu.

2.2.4. Chemoterapie

Nepatří mezi standardní léčebné metody maligního melanomu. V současné době není známa účinná látka, která by jednoznačně zlepšovala prognózu pacientů. Zlatým standardem cytostatické léčby u pacientů s maligním melanomem v pokročilém stadiu je dakarbazin. Nicméně dosažená léčebná odpověď se pohybuje maximálně kolem 15 – 20 %, tedy na hranici použitelnosti. Vyšších léčebných odpovědí se snažíme dosáhnout kombinovanými režimy. Od adjuvantního podávání chemoterapie se upouští (jako jediná smysluplná adjuvantní léčba melanomu v současnosti se jeví terapie vysokodávkovaným interferonem α), zvažována je paliativní chemoterapie při diseminovaném onemocnění. Nejčastěji používané režimy jsou: BHD (BCNU, hydroxyurea, dakarbazin), BOLD (bleomycin, vinkristin, lomustin, dakarbazin), CVD (cisplatina, vinblastin, dakarbazin), CBDT (cisplatina, BCNU, dakarbazin, tamoxifen) (54).

2.3. Biologie melanomu

Melanom je komplexní nádorové onemocnění, které vzniká maligní transformací pigment-produkujících buněk melanocytů. Tento proces je velmi komplikovaný a kromě mnoha známých i neznámých mechanismů v něm hraje významnou úlohu i dědičnost. Familiární melanomy tvoří asi 8 - 12 % všech identifikovaných případů melanomu a v jejich genetickém podtextu hrají úlohu mutace v různých genech, jakými jsou např. inhibitor buněčného cyklu p16^{INK4a}, cyklin dependentní kináza 4 (CDK4), s G proteinem spjatý receptor MC1R a další. I přes významnou roli, kterou zděděné mutace hrají při vzniku a rozvoji maligního melanomu, jejich analýzy spojené s epidemiologickými studiemi naznačily, že pro vznik a rozvoj tohoto nádorového onemocnění, a to zejména jeho sporadické formy, jsou nutné mutace v dalších genech. V současné době je známo mnoho genů, jejichž mutace či defektní exprese charakterizuje maligní melanocyty. Některé z těchto genů tvoří komponenty obecně známých signálních drah, jiné mají samostatný či nejasný status a jejich zapojení do buněčné signalizace v rámci stávajících modelů čeká na objasnění. V Tab. 2-3 jsou shrnuty vybrané geny a jejich poškození u maligního melanomu. V následujícím krátkém přehledu jsou dále stručně vysvětleny nejprozkoumanější deregulované signální dráhy tohoto nádorového onemocnění.

2.3.1. Signální dráha mitogeny aktivovaných proteinových kináz (Ras/Raf/MEK/ERK)

Signální dráha zahrnující Ras/Raf/MEK/ERK reguluje buněčný cyklus a osud buněk transdukcí signálů z receptorových tyrosinových kináz (RTK), cytokinů a heterotrimerických s G-proteinem spjatých receptorů **(95)**. V buněčných liniích melanocytů jsou proliferace, diferenciace a přežívání velmi striktně regulovány a vyžadují synergistickou parakrinní stimulaci růstovými faktory. Tyto růstové faktory zahrnují např. faktor kmenových buněk (SCF), růstový faktor pro fibroblasty (FGF) a růstový faktor pro hepatocyty (HGF) **(11)**, ale individuálně tyto faktory vyvolávají pouze slabou či přechodnou aktivaci ERK, což vede k velmi nevýraznému mitogennímu účinku. Takže pro stimulaci proliferace melanocytů prostřednictvím ERK je nutná simultánní přítomnost několika faktorů **(110)**. Tato dráha ostatně patří ke klíčovým regulačním mechanismům i u melanomových buněk, protože ERK dle dostupných informací bývá hyperaktivována až u 90 % všech melanomů **(17)**. Aktivace ERK u melanomů může být způsobena několika příčinami, přičemž častěji to bývá prostřednictvím mutací v Nras genu, který je mutován asi u 15-30 % melanomů **(18)**.

Nejčastěji mutovanou molekulou této signální dráhy je Braf – jeden ze tří lidských genů Raf (další jsou Araf a Craf). Braf je mutován u 50-70 % všech melanomů **(18)**. BRAF stimuluje konstitutivní signalizaci ERK, která vede k zesílené proliferaci a přežívání buněk, což vytváří předpoklady k růstu a expanzi nádoru **(29)**. BRAF také přispívá k neoangiogenezi, a to prostřednictvím stimulace sekrece autokrinního vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) **(92)**. Během posledních let bylo identifikováno i několik genů, které jsou transkripčně regulovány prostřednictvím BRAF; tyto mimo jiné zahrnují transkripční faktory – s mikrooftalmií asociovaný transkripční faktor MITF **(109)**, regulátory buněčného cyklu – cyklin D1 a p16^{INK4a} **(10, 67)**, matrixovou metaloproteinázu-1 **(44)** a další.

2.3.2. Signální dráha Ras-ERK a fosfatidylinositol-3-kinázy

Jinou nově se objevující signální drahou, která pravděpodobně hraje významnou úlohu při rozvoji maligního melanomu je dráha fosfatidylinositol-3-kinázy (PI(3)K). Fosfatidylinositoly jsou membránové lipidy, které se přeměňují ve druhé posly prostřednictvím hyperfosforylace jednou rodinou PI(3) kináz **(93)**. Tito druzí poslové aktivují celou řadu downstream efektorových signálních drah, přičemž signalizace je ukončena lipidovou fosfatázou PTEN (fosfatázový a tenzinový homolog). Celá tato signalizace reguluje buněčné přežívání, proliferaci, růst a motilitu a u velké části melanomů je hyperaktivována. Důvodem této hyperaktivace jsou mutace v PI(3)K (cca 3% výskyt u melanomů) **(73)**, ztráta funkce PTEN (cca 5-20% výskyt u pokročilých melanomů) **(112)** a zvýšená exprese PI(3)K efektorové proteinové kinázy B (PKB) – AKT (cca 60% výskyt u melanomů) **(98)**.

Experimentální studie na kulturách melanomových buněk *in vitro* naznačují, že k inhibici růstu melanomu je nutno inaktivovat jak ERK tak PI(3)K signalizaci **(96)**. Je pozoruhodné, že u melanomu se mutace v Nras a Braf vzájemně vylučují stejně tak jako mutace v Nras a Pten, ale mutace v Braf a Pten se vyskytují společně až ve 20 % případů **(103)**. Epistatický vztah mezi oběma geny nebyl sice prokázán, ale tyto vzájemné vztahy mezi mutacemi korespondují se současným stavem našich vědomostí ohledně fungování a regulace této signální dráhy.

2.3.3. Signalizace Mitf

MITF je transkripční faktor, který je považován za klíčový regulátor v biologii melanocytů, protože reguluje expresi melanogenních proteinů jakými jsou např. tyrosinázy,

stříbrný homolog (GP100) a s melanomem asociovaný antigen rozpoznávaný T buňkami-1 (MART-1 také známý jako melan-A) (58). MITF však také reguluje přežívání melanoblastů a jejich liniovou determinaci a je považován za klíčovou molekulu melanomu. Je totiž exprimován ve většině klinicky diagnostikovaných melanomů a jeho cílové geny tvoří základní diagnostické markery tohoto onemocnění. Kromě toho udržuje i vysokou úroveň proliferace a přežívání maligních melanocytů (58).

Nedávno opublikované práce naznačily možnost spolupráce Mitf s Braf při transformaci melanocytů (26), což by znamenalo, že Mitf může fungovat jako pro linie specifický „návykový onkogen“, a to patrně proto, že umožňuje buňkám přežít a podporuje jejich proliferaci (26).

U určité části maligních melanomů, které nesou mutaci v Braf (cca 10-16 %), může být Mitf amplifikován. I když amplifikace samotného genu může dosáhnout 10ti až 100 násobné výše, hladiny proteinu MITF jsou oproti buňkám s neamplifikovaným genem pouze 1,5 násobné což znamená, že koncentrace proteinu MITF jsou velmi striktně regulovány, a to v úzkém rozmezí (26).

2.3.4. Signální dráha Wnt/ β -katenin

Beta katenin představuje centrální molekulu Wnt (wingless) signální transdukční dráhy, která hraje významnou úlohu při vzniku a rozvoji tumorigeneze. Intracelulární koncentrace β -kateninu jsou striktně regulovány multiproteinovým komplexem skládajícím se z APC (adenomatous polyposis coli) tumor supresorového proteinu, axinu a dalších (8). V nepřítomnosti signálu Wnt, tento komplex fosforyluje β -katenin, který je pak následně degradován prostřednictvím ubikvitin-proteasomové dráhy (78).

Onkogenní aktivace β -kateninu byla demonstrována u významného počtu melanomových linií (23 %) (84), i když mutace v β -kateninu jsou u primárního melanomu vzácné (74). Na druhou stranu téměř jedna třetina vyšetřovaných vzorků primárních melanomů vykazovala zvýšenou nukleární akumulaci β -kateninu (82). Pokročilé a metastazující melanomy obsahují zvýšené množství β -kateninu v cytoplazmě i v jádře buněk a současně vykazují zvýšenou, na TCF/LEF závislou transkripci (71).

2.3.5. Signální dráha buněčné smrti - apoptózy

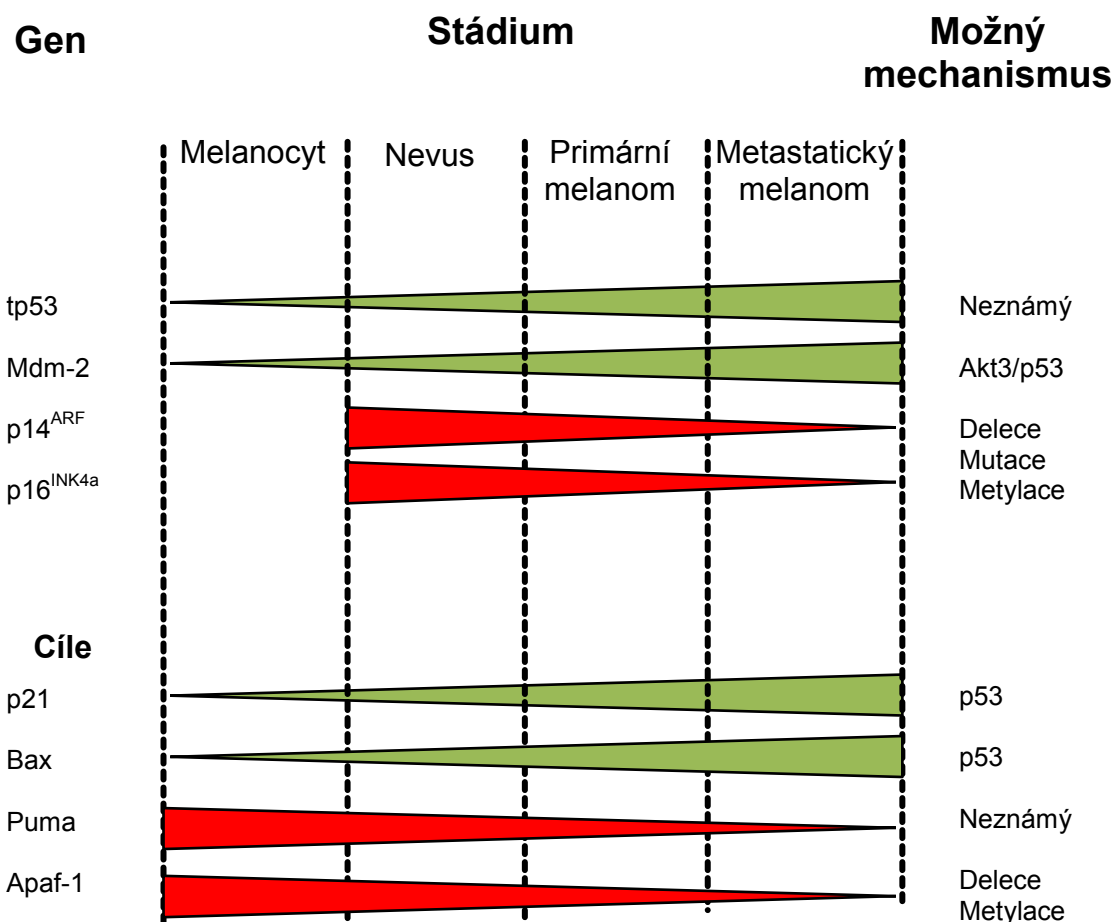
Programovaná buněčná smrt – apoptóza představuje evolučně konzervovaný mechanismus, který slouží k regulaci počtu funkčních buněk v mnohobuněčných organismech. Na základě dlouholetých studií jsou dnes známy mnohé podrobnosti o jednotlivých proapoptotických i antiapoptotických mediátorech v eukaryontní buňce a jejich organizaci a regulaci v rámci signálních drah a jednotlivých kompartmentů. Klasicky dnes rozpoznáváme dvě základní (kanonické) dráhy aktivace apoptózy; vnější, která postupuje přes vnější receptory **(4)** a vnitřní, která zahrnuje např. poškození DNA s následnou aktivací genu *tp53* **(94)**. Obě dráhy neexistují odděleně, ale jsou prostřednictvím mnoha mediátorů propojeny **(48)** a obě také vedou k mitochondriím jako k ústřednímu buněčnému kompartmentu, který je v tomto případě odpovědný za aktivaci exekuční fáze apoptózy **(55)**. Detailní popis celého procesu apoptózy jde nad rámec teoretického úvodu této práce, podrobnosti lze nalézt v mnoha literárních zdrojích, z nichž jsou některé zmíněny na tomto místě **(3, 21, 36, 102, 117)**.

V buňkách maligních nádorů je obecně schopnost aktivovat apoptózu potlačena, a to prostřednictvím mnoha různých mechanismů. Často se jedná o velmi časný jev, v případě lidského melanomu je možno zaznamenat změny v expresi antiapoptotického proteinu BCL-2 již u benigních melanocytických proliferací **(14)**. Množství experimentálních studií prokázalo, že u melanomu dochází k změnám jak ve vnější tak ve vnitřní dráze apoptózy **(31)**.

U vnější dráhy aktivace apoptózy dochází u buněk melanomu k chybné signalizaci mezi smrtícími receptory a jejich efekty, přičemž exprese těchto receptorů bývá potlačena nebo přímo inhibována. Jako příklad může posloužit zvýšená aktivita nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B), který transkripčně potlačuje apoptózu vyvolanou tumor nekrotizujícím faktorem alfa (TNF α) **(49)**. Také změny v expresi a aktivitě Fas receptoru jsou u melanomů časté. Mutace ve smrtící doméně Fas receptoru se vyskytují asi u 7 % všech melanomů a vedou ke tvorbě mutovaného proteinu, který není schopen interagovat s kaspázou-8 a aktivovat hlavní exekuční enzym kaspázu-3. U melanomů se ještě častěji vyskytuje transkripční potlačení exprese receptoru Fas, které může souviset i s vyšší aktivitou NF- κ B **(49)**.

U vnitřní dráhy aktivace apoptózy dochází v případě melanomu ke zvýšení exprese některých antiapoptotických proteinů jakými jsou např. výše zmíněný protein Bcl-2 **(90)** či inhibitory apoptózy zahrnující survivin, livin, c-IAP, XIAP a MCL-1 **(12)**. Oproti tomu

některé proapoptické molekuly jako např. BAX či APAF-1 jsou u melanomu inhibovány či úplně odstraněny (97, 100). Samostatnou kapitolou je pak gen tp53. Tento gen je u melanomů mutován relativně sporadicky (cca 10 % případů), ale jeho funkce a správná signalizace celé, na něm závislé kaskády jsou často u melanomu poškozeny (88). V současné době není dosud jasné, proč s rozvojem melanomu stoupá v jeho buňkách hladina proteinu p53. Jedním z možných vysvětlení je delece či ztráta exprese genu p16^{INK4a}, která doprovází maligní transformaci melanocytů a je nutným předpokladem k překonání jejich senescence. Současně se stoupající hladinou p53 stoupá i koncentrace p53 regulujícího proteinu MDM-2. Na druhé straně klesá exprese genů Bax a Puma, které jsou genem p53 transaktivovány (13). Přehled změn v expresi proteinů v na p53 závislé signální dráze během progresu melanomu je schematicky znázorněn na Obr. 2-3.



Obr. 2-3 Schématické znázornění účasti molekul tp53 závislé signální dráhy v různých stádiích vývoje melanomu. Upraveno dle (13).

2.3.6. Ostatní signální dráhy a molekuly

Proteiny tepelného šoku (HSPs) patří mezi významné buněčné chaperony, které plní ochrannou a regulující úlohu, a to zejména ve stresových situacích. Tyto proteiny jsou na základě své molekulové hmotnosti rozděleny do pěti skupin, přičemž každá z nich zahrnuje několik zástupců plnicích identifikované nebo dosud ne zcela pochopené úlohy (69). HSP90 patří mezi nejvíce exprimované chaperony, které udržují stabilitu a funkci mnoha buněčných proteinů. Protože u nádorových buněk bývá mnoho proteinů, které jsou regulovány HSP90, změněno, následně stoupá také exprese vlastního chaperonu, což je případ maligního melanomu (104). Vzhledem k vysoké expresi, a to včetně povrchu melanomových buněk, představuje dnes HSP90 atraktivní cíl cílené terapie melanomu ať už v přímé podobě nebo prostřednictvím specifických vakcín (28).

TYP GENU	Gen	Frekvence genetické změny/typ u melanomů
Onkogeny	Braf	50-70 % mutace
	Nras	15-30 % mutace
	Akt3	zvýšená exprese
Tumor supresorové	Cdkn2A	30-70 % delece, mutace či vyřazení z funkce
	Pten	5-20 % delece či mutace
	Apaf-1	40 % vyřazení z funkce
	tp53	10 % ztráta či mutace
Jiné	Cyklin D1	6-44 % amplifikace
	Mitf	10 -16 % amplifikace

Tab. 2-3 Vybrané geny a jejich poškození u maligního melanomu

2.4. Topoisomerázy a jejich role v buňce

Topoisomerázy (přesněji DNA topoisomerázy) jsou jaderné enzymy poprvé popsané v rámci enzymatické aktivity bakterie *Escherichia coli* v roce 1971. Jejich základní funkcí je vytvoření přechodných zlomů v molekule DNA, aniž by došlo ke změně její chemické struktury (38). Jinými slovy umožňují měnit tzv. terciární strukturu (supercoiling) DNA, a to bez vlivu na sekundární a primární strukturu.

Nejběžnější systém klasifikace DNA topoisomeráz je založen na mechanismu jejich účinku. Rozlišujeme dva základní typy těchto enzymů.

Enzymy typu I (zahrnují topoisomerázy I a III) se váží na dvoušroubovici DNA a vytvářejí na ní jednovláknové zlomy. Poté zůstávají kovalentně navázané na 5' konci zlomu (podrodina IA) či na 3' konci zlomu (podrodina IB). Uplatňují se v syntetické fázi (S fáze) buněčného cyklu, kdy rozpojením jednoho řetězce molekuly DNA uvolní nadměrný tlak vznikající tvorbou replikační vidlice a posléze přerušeny řetězec opět spojí. Časově omezené přerušení řetězce DNA umožní zahájení replikace. Topoisomerázy typu I existují pouze v monomerní podobě a katalýzu vykonávají bez potřeby ATP. Vedle katalytické aktivity se topoisomerázy typu I asociují také s chromozomy, kde se mohou účastnit jejich funkční organizace a regulace (107).

Enzymy typu II (zahrnují topoisomerázy II α a II β) se váží na dvoušroubovici DNA a vytvářejí na ní oboustranné zlomy. Poté zůstávají kovalentně navázané na 5' konci zlomu (46). Současně odpovídají za opětovné spojení přerušovaných řetězců a umožňují tak separaci chromozomů v mitotické fázi (M fáze) buněčného cyklu. Topoisomerázy typu II existují v homodimerické nebo heterodimerické formě a jejich aktivita je závislá na ATP. Výsledky některých experimentálních prací naznačují možnou aktivitu enzymů této skupiny v postreplikačních stádiích buněčného cyklu, což by naznačovalo, že mohou mít i strukturní roli (114).

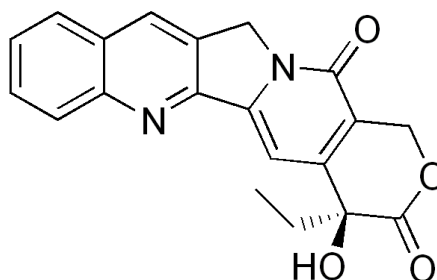
DNA topoisomerázy byly identifikovány v eukaryontních i prokaryontních buňkách. U člověka bylo prokázáno celkem pět variant těchto enzymů – topoisomeráza I, II α , II β , III α a III β . Všechny ovlivňují topologii DNA (tj. brání překroucení dvoušroubovice DNA, zlomu v řetězci a ztrátě funkce DNA), ovšem pouze tři z nich (topoisomeráza I, II α a II β) jsou relevantní v léčbě nádorových onemocnění (85). Zablokováním jejich činnosti nedojde ke spojení vzniklých zlomů v DNA a postižená buňka umírá.

2.5. Inhibitory topoisomeráz¹

Inhibitory topoisomerázy I zahrnují kamptotecin s deriváty (topotekan, irinotekan) a jejich analoga. Nově jsou do této skupiny zařazovány také některé další chemicky odlišné látky (např. protobereberinové alkaloidy a naftochinony) (6, 20).

¹ Z hlediska novějšího pohledu se látky interagující s topoisomerázami II α dělí na topoisomerázové jedy (poisons), které mimo jiné zvyšují hladiny komplexů topoisomerázy a DNA a kam patří většina klinicky používaných léčiv této kategorie např. etoposid a topoisomerázové inhibitory, které hladiny výše zmíněných komplexů nezvyšují a kam patří nověji vyvíjená léčiva skupiny bisdioxopiperazinů jako např. ICRF-159.

Kamptotecin. Je to quinolinový alkaloid izolovaný z kůry asijského stromu *Camptotheca accuminata* (Nyssaceae). V roce 1996 schválil americký FDA použití derivátů kamptotecinu (topotekan – Hycamtin®, irinotekan HCl – Camptosar®) pro klinickou praxi. Uplatnění tyto deriváty našly v léčbě ovariálního karcinomu a metastazujícího kolorektálního karcinomu. Použití kamptotecinu a jeho derivátů v léčbě maligního melanomu je dosud ve stadiu klinických studií.



Obr. 2-4A Strukturální vzorec kamptotecinu

Účinnost inhibitorů topoisomerasy I je vázána na koncentraci tohoto enzymu v cílové nádorové tkáni. Nízké koncentrace topoizomerasy I aktivitu inhibitorů snižují, ale nevylučují. Příčinou je proapoptotický účinek těchto látek pomocí aktivace proteinu p53, dále serinových proteáz a endonukleáz.

Topotekan. Je to polosyntetický derivát kamptotecinu používaný ve formě hydrochloridu. Po nitrožilním podání se částečně váže na plazmatické proteiny (cca 35 %), jeho distribuce mezi plazmou a krevními elementy je homogenní. Metabolizuje se velmi rychle hydrolyzou laktonového kruhu za vzniku hydroxykyseliny s otevřeným kruhem. Vylučuje se převážně močí, jednak ve formě metabolitů, jednak v nezměněné formě. Poločas vylučování je 2-3 hodiny (99). Indikací pro použití topotekanu je ovariální karcinom rezistentní na podávání cisplatinu. Pro své synergistické účinky s etoposidem a cisplatinou je předpokládáno jeho další využití v klinické onkologii. Průměrná dávka je 1.5 mg/m²/den v pětidenním cyklu. Nejvýznamnějším vedlejším účinkem je myelotoxicita.

Irinotekan. Je to polosyntetický derivát kamptotecinu. V organismu prodělává rychlou metabolickou přeměnu v játrech a gastrointestinálním traktu. Působením karboxyesterázy je konvertován na aktivní metabolit 7-ethyl-10-hydroxykamptotecin (SN 38), který má až o 2 řády vyšší protinádorovou účinnost. Z tohoto hlediska se irinotekan jeví jako prolečivo. Vylučuje se ledvinami, proces je třífázový s poločasy 12 minut, 2,5 hodiny a 14,2 hodiny. Vysoké koncentrace byly nalezeny také v potu, ve slinách a v pleurální tekutině. Kinetický profil irinotekanu není závislý na dávce (99). Indikací pro použití irinotekanu je metastazující

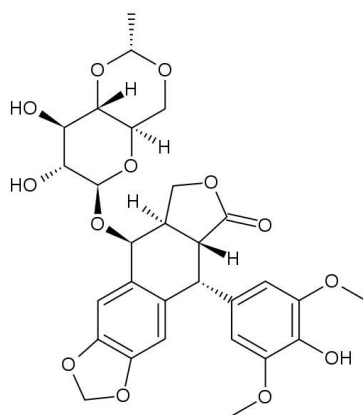
kolorektální karcinom rezistentní na léčbu 5-flourouracilem. Alternativně je používán v léčbě bronchogenního karcinomu, karcinomu prsu, ovaria a děložního hrdla. Kombinuje se často s etoposidem, cisplatinou a mitomycinem C. Průměrná dávka je 300 – 350 mg/m² v infuzi (30-90 minut) každé 3 týdny. Z nežádoucích účinků je nepříjemný především cholinergní syndrom s profuzním pocením, průjmem, břišní kolikou, sliněním a slzením. Běžná je neutropenie v krevním obraze a alopecie.

Inhibitory topoisomerázy II tvoří chemicky velmi heterogenní skupinu látek. Některé stabilizují komplex kovalentně navázané topoisomerázy II na molekulu DNA (deriváty podophyllotoxinu etoposid, teniposid a etoposid fosfát), jiné interferují s jakýmkoli jiným krokem celého katalytického cyklu (cytostatikum akklarubicin, kardioprotektivum ICRF-187, modulační faktor novobiocin) (57).

Podophyllotoxin je přírodní lignin izolovaný z rhizomů a kořenů asijské rostliny *Podophyllum emodi* Wall. (Berberiaceae).

Protinádorový účinek derivátů podophyllotoxinu je podmíněn udržením jejich účinné koncentrace v krvi po dobu nejméně 3-5 dnů. Tímto způsobem je vysvětlována vyšší účinnost v případě opakovaného podávání nižší dávky ve srovnání s jednorázovou aplikací vysoké dávky.

Etoposid. Je to polosyntetický derivát podophyllotoxinu, který se od své mateřské sloučeniny liší mechanismem protinádorového účinku. V klinické praxi je už od roku 1971, přičemž spektrum jeho použití je velmi široké. Má synergní účinky s cisplatinou a cytarabinem. Po nitrožilním podání se váže na bílkoviny krevní plazmy, ale jeho distribuce v jednotlivých orgánech je značně nerovnoměrná. Proniká také do pleurální dutiny, byl zjištěn ve slinách, játrech, ledvinách, ve slezině, děložní svalovině a mozkové tkáni. Křivka exkrece z plazmy je dvoufázová, poločasy jsou 30-40 minut a 100-120 minut. Metabolizuje se na hydroxykyselinu, která je farmakologicky neaktivní. Další metabolity zahrnují glukuronid a konjugáty sulfátu. Vylučuje se převážně játry (cca 65-70 %), glukuronidy se vylučují ledvinami. Clearance etoposidu koreluje s clearance kreatininu (99). Velkou výhodou tvoří možnost perorální aplikace etoposidu (dobrá resorpce z trávicího traktu, maximální plazmatické hladiny je dosaženo během 2 hodin po podání), nevýhodou jsou naopak četné nežádoucí účinky v podobě útlumu krvetvorby, alopecie a mukozitidy.



Obr. 2-4B Strukturní vzorec etoposidu

Hlavními indikacemi podání jsou některé druhy akutních leukemií, NHL a řada solidních nádorů (bronchogenní karcinom, testikulární nádory, nádory ovaria, sarkomy měkkých tkání). Průměrná dávka je 100-120 mg/m²/den po dobu 3-5 dnů, perorální dávky jsou cca dvojnásobné. Ve vyšších dávkách se používá jako součást předtransplantačních programů.

Teniposid. Je to polosyntetický derivát podophyllotoxinu. Snadno proniká hematoencefalickou bariérou, vylučuje se játry, částečně ledvinami. Terminální poločas je 21 hodin. Pro značnou variabilitu resorpce je jedinou aplikační cestou nitrožilní podání v infuzi (průměrná dávka je 30 mg/m² po dobu 5 dnů) (99). Spektrum jeho použití zahrnuje myelomonocytární leukemii, maligní lymfomy, bronchogenní karcinom, karcinom děložního hrdla a močového měchýře.

Etoposid fosfát. Je to hydrosolubilní derivát etoposidu, který se po nitrožilním podání mění rychle a kompletně defosforylací v plazmě na biologicky aktivní etoposid.

3. CÍLE PRÁCE

1. U vybraných modelových linií melanomu ověřit expresi topoisomerázy I a topoisomerázy II α .
2. Ve vybraném modelu lidských melanomových buněk s nemutovaným genem tp53 ověřit cytotoxicitu a antiproliferační aktivitu inhibitorů topoisomerázy I (kamptotecin) a topoisomerázy II α (etoposid).
3. Studovat buněčnou odpověď na výše zmíněné cytotoxické látky ve smyslu navození poškození DNA a aktivace specifické signalizační dráhy (DNA-damage pathway).
4. Ověřit úlohu genu tp53 při buněčné odpovědi melanomových buněk na inhibitory topoisomeráz.
5. Monitorovat možnou aktivaci tzv. alternativních stresových signálních drah u melanomových buněk po použití inhibitorů topoisomeráz.
6. Zaměřit se a podrobněji popsat mechanismy aktivace apoptózy u melanomových buněk vystavených inhibitorům topoisomeráz, a to zejména s přihlédnutím k úloze mitochondrií.
7. Porovnat účinnost cytotoxického působení inhibitorů topoisomeráz u melanomových buněk lišících se stavem genu tp53 – nemutovaný (wild-type) a mutovaný (mutated) a zhodnotit účinnost simultánní inhibice topoisomerázy I a II α v tomto buněčném modelu.

4. METODIKY

4.1. Chemikálie a reagensie

BRISTOL MEYERS SQUIB: Etoposid (Vepesid inj.)

SIGMA-ALDRICH: Kamptotecin; fenolová červeně; 4', 6-diamidino-2-fenylindol (DAPI); Triton X; dimetylsulfoxid (DMSO); 3-[(3-cholamidopropyl)dimetylamonio]-1-propanesulfonová kyselina (CHAPS); ditiotritol (DTT); propidium jodid; β -aktin; Coomassie Brilliant Blue; bovinní sérový albumin (BSA); Dulbekovo modifikované Eaglovo médium (DMEM); neutrální červeně; paraformaldehyd; ribonukleáza A; cyklosporin A; 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát; N-acetylcystein (NAC); specifický inhibitor c-Jun N kinázy SP600125, trypanová modř; bromodeoxyuridin (BrdU); etidium bromid

BOEHRINGER MANNHEIM-ROCHE: 5-(2,4-disulfonatofenyl)-3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-tetrazolium (WST-1); Cell proliferation ELISA BrdU kit

GIBCO: penicilin; streptomycin; trypsin/EDTA

PAA: fetální bovinní sérum (FBS)

CALBIOCHEM: MnIII Tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porfyrin pentachlorid (MnTMPyP); Pifitrin- α ; Pifitrin- μ ; specifický inhibitor kaspázy-2 VDVAD-fmk; specifický inhibitor kaspázy-9 Ac-LEHD-AFC; specifický inhibitor kaspázy-3 DEVD-AFC, specifický pan-kaspázový inhibitor z-VAD-fmk; specifický inhibitor ATM kinázy (2-Morfolin-4-yl-6-tiantren-1-yl-pyran-4-on); specifický inhibitor kinázy p38 SB 203580

MOLECULAR PROBES: JC-1; JC-9; Organelle LightsTM Mito-GFP, SlowFade[®] medium

CELL SIGNALLING TECHNOLOGY, INC.: protilátky proti topoisoméráze II α ; BAX; BCL-2; BCL-XL; BID; MCL-1; PUMA; H2A.X fosforylované na Ser-139; p53; p53 fosforylované na Ser-15; p53 fosforylované na Ser-46; p53 fosforylované na Ser-392; rozštěpenému PARPu; kaspáze-2; ATM; ATM fosforylované na Ser-198; XIAP; survivin; HSP-27; kity SignalSilence[®] Pool Bax siRNA

SANTA CRUZ: protilátky proti topoisoméráze I; p73 a Noxa

ALEXIS: sekundární protilátky

ICN BIOMEDICALS, INC.: specifický inhibitor proti kaspáze-8

4.2. Buněčné kultury – charakterizace

Ve vlastní práci byly použity tyto lidské stabilizované buněčné linie:

- A. Bowes (ATCC, No. CRL – 9607, Manassas, USA), která je vysoce motilní a metastazující, ale nevykazuje dediferenciaci v kultuře a exprimuje specifické antigeny lidských melanomových, epitelíím podobných buněk. Gen tp53 má nemutovaný (divoká forma).
- B. WM-115 (ECACC, 91061232, Porton Down, UK), která si udržuje epiteloidní morfolonii a její gen tp53 je nemutovaný (divoká forma).
- C. A2058 (ECACC, No. 91100402, Porton Down, UK), která je epiteloidní, metastazující a gen tp53 má nemutovaný (divoká forma).
- D. SK-MEL-28 (ATCC, No. HTB-72, Manassas, USA), která je maligní pigmentovaná, epiteloidního typu s mutovaným genem tp53.

4.3. Buněčné kultury – kultivace

Všechny linie byly udržovány jako stacionární kultury v monolayeru. Buňky byly pěstovány za standardních laboratorních podmínek při 37 °C a 5 % CO₂ v Dulbekově modifikovaném Eaglově médiu (DMEM) obohaceném 10 % fetálního bovinního séra, penicilinem G (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml). Linie byly pasážovány podle pokynů tkáňových bank v průměru dvakrát týdně pomocí 0,05 % trypsinu/EDTA. Kultury byly pravidelně testovány na přítomnost mykoplazmat.

4.4. Ovlivnění buněk

Z etoposidu (ETO) byl připraven zásobní roztok o koncentraci 20 mg/5ml naředěním originálních ampulí do aqua pro inj. a po sterilizaci ultrafiltrací uložen při teplotě 4 °C. Finální testované koncentrace byly získány naředěním zásobního roztoku do bezsérového média.

Zásobní roztok kamptotecinu (CPT) (10 mg/ml) byl připraven rozpuštěním substance v DMSO a tento roztok byl uložen při pokojové teplotě (RT). Finální testované koncentrace byly získány naředěním zásobního roztoku do bezsérového média.

Pracovní koncentrace použitých farmakologických látek a inhibitorů byly získány naředěním jejich zásobních roztoků do příslušných rozpouštědel dle instrukcí výrobce: NAC (antioxidant, 1 mM – přidáný k buňkám 24h před použitím inhibitorů topoisomeráz), Pifitrin- α (inhibitor p53, 30 µM – přidáný k buňkám 24h před použitím inhibitorů topoisomeráz),

Pifitrin- μ (inhibitor translokace p53, 20 μ M – přidáný k buňkám 12h před použitím inhibitorů topoisomeráz), SP600125 (inhibitor JNK, 10 μ M - přidáný k buňkám 30 min před použitím inhibitorů topoisomeráz), SB203580 (inhibitor p38, 10 μ M - přidáný k buňkám 30 min před použitím inhibitorů topoisomeráz) z-IETD-fmk (inhibitor kaspázy-8, 10 μ M - použitý současně s inhibitory topoisomeráz), inhibitor ATM (10 μ M - přidáný k buňkám 30 min před použitím inhibitorů topoisomeráz), cyklosporin A (5 μ M, použitý současně s inhibitory topoisomeráz), inhibitory kaspázy-2, kaspázy-9 a kaspázy-3 (všechny 30 μ M, přidáné k buňkám 1h před použitím inhibitorů topoisomeráz).

4.5. Test buněčné proliferace měřením aktivity mitochondriálních enzymů (WST-1) a stanovením množství proteinů v buňkách (Coomassie Brilliant Blue)

Buňky v logaritmické fázi růstu byly opláchnuty balancovaným fyziologickým roztokem PBS bez vápenatých a hořečnatých iontů, převedeny do suspenze pomocí 0,05% roztoku trypsinu/EDTA a resuspendovány v 10 ml kultivačního media. Vzorek suspenze byl obarven 0,1% roztokem trypanové modři. Po jejich spočítání byly naředěny do výsledné koncentrace 30 000 buněk/ml a nasazeny do 96-jamkové destičky (ek) s víčkem (ky) (Nunclon, Roskilde, Dánsko) v množství 0,2 ml/jamku, tj. 6000 buněk na jamku. Sloupce č. 1 a 2 byly vždy bez buněk - sloužily jako slepý pokus. Druhý den bylo v jamkách vyměněno medium za 200 μ l/jamku media s testovanou látkou a kultivováno v termostatu při 37 °C, 5 % CO₂, 95 % vzduchu a 100 % humiditě v různých časových intervalech. Po uplynutí doby ovlivnění bylo v daných sloupcích vyměněno medium s testovanou látkou za 100 μ l/jamku media s WST-1 a po dvouhodinové kultivaci v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂, 95 % vzduchu měřena absorbance při 450 nm proti 690 nm. Po měření byly kultury vypláchnuty a fixovány metanolem po dobu 20 minut. K buňkám byl poté přidán na 1h roztok Coomassie Brilliant Blue (200 μ l/ jamku). Po skončení kultivace byly buňky opláchnuty PBS a 1h kultivovány v desorpčním roztoku (200 μ l/ jamku) na třepačce. Výsledná absorbance byla měřena na fotometru Titertec Multiscan MCC/340 (ICN Biochemicals, Frankfurt, Spolková Republika Německo) při 450 nm s referenční vlnovou délkou 650 nm.

4.6. Test buněčné proliferace měřením DNA syntézy

Buňky v logaritmické fázi růstu byly opláchnuty balancovaným fyziologickým roztokem PBS bez vápenatých a hořečnatých iontů, převedeny do suspenze pomocí 0,05% roztoku trypsinu/EDTA, resuspendovány v 10 ml kultivačního media a obarveny 0,1% roztokem trypanové modři. Po jejich spočítání byly naředěny do výsledné koncentrace 30 000

buněk/ml a nasazeny do 96-jamkové destičky (ek) s černým dnem (Nunclon, Roskilde, Dánsko). Sloupce č. 1 a 2 byly vždy bez buněk - sloužily jako slepý pokus. Druhý den bylo v jamkách vyměněno medium za 200 μ l/jamku media s testovanou látkou a kultivováno v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂, 95 % vzduchu v různých časových intervalech. Dvě až 24h před koncem inkubace bylo k buňkám přidáno BrdU (10 μ M). Na konci inkubační doby bylo médium aspirováno, buňky byly fixovány (30 min, RT) a značeny anti-BrdU (60 min, RT). Následně byly buňky opláchnuty (3x) a byl k nim přidán substrát luminol. Chemiluminescence byla měřena mikrofluorimetricky pomocí TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grödig, Rakousko). Při všech měřeních byl použit integrační čas 1000 ms and gain 130. Výsledky ve formě relativních jednotek světla (RLU) byly vyjádřeny jako % kontroly.

4.7. Test poškození DNA: varianta – mikrofluorimetrické stanovení histonu H2A.X

Ovlivněné a kontrolní buněčné kultury byly v různých časových intervalech opláchnuty roztokem PBS a fixovány v 4% formaldehydu (30 min, 20°C). Po oplachu PBS byl přidán blokovací roztok (50 μ l 5% odtučněného mléka, 30 min, 20°C) a primární protilátka (anti-fosfo Ser-139 H2A.X, 1:100, 90 min). Po uplynutí časového intervalu byly buňky promyty PBS a inkubovány se sekundární protilátkou (1:250, 60 min). Přítomnost fosforylovaného histonu H2A.X v buňkách byla stanovena na mikrofluorimetru TECAN SpectraFluo Plus (TECAN Austria GmbH, Grödig, Rakousko) při vlnové délce 485/520 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako přírůstek fluorescence v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami.

4.8. Test poškození DNA: varianta – Comet assay (alkali single-cell gel electrophoresis)

Ovlivněné a kontrolní buněčné kultury byly v různých časových intervalech převedeny do suspenze pomocí roztoku trypsinu (0,05%) a centrifugovány (1500 rpm, 5 min, 4°C, JOUAN MR 22, Trigon, Praha, Česká republika). Buněčný pelet byl resuspendován v 0.6% agaróze a nanesen na mikroskopická sklíčka. Následně byly buňky 1,5 hodiny lyzovány ve vychlazeném lyzačním pufru (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma, 1 % Triton X-100 and 10 % DMSO) při teplotě 4°C. Buňky byly dále opláchnuty v roztoku TRIS a během 30 min inkubovány v alkalickém pufru. Elektroforéza probíhala při 25 V a 300 mA během 30 min. Po neutralizaci a odvodnění byly buňky na sklíčkách obarveny 100 μ l roztoku etidia

bromidu. Pro účely analýzy byla hodnocena intenzita migrace rozvolněné DNA u 100 buněk ze tří samostatných vzorků.

4.9. ELISA stanovení exprese Chk1

Ovlivněné a kontrolní buněčné kultury byly převedeny do suspenze, opláchnuty roztokem PBS a koncentrovány centrifugací (600 g, 5 min, JOUAN MR 22, Trigon, Praha, Česká republika). Následně byly připraveny celobuněčné extrakty a exprese Chk1 a Chk1 fosforylované na Ser-317 byla stanovena pomocí PathScan[®] Chk1 a Phospho-Chk1 (Ser317) Sandwich ELISA kity (Cell Signaling Technology, Inc., Eugene, USA) podle pokynů výrobce. Absorbance byla zaznamenávána při 450 nm na mikrofluorimetru TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grödig, Rakousko).

4.10. Stanovení oxidativního stresu

Ovlivněné a kontrolní buňky byly v daných časových intervalech převedeny do suspenze pomocí tkáňové škrabky a centrifugovány (50 g, 5 min, 4 °C – JOUAN M21, Trigon, Praha, Česká republika). Následně byly buňky resuspendovány v DMEM (pH adjustováno na 7.2) a k roztoku byl přidán 5 μ M 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (DFCH/DA) (5 min, 37 °C). Změny v intenzitě fluorescence (485 nm excitace; 538 nm emise) byly měřeny spektrofotometrem Shimadzu UV – 1601 (SHIMADZU DEUTSCHLAND GmbH, Duisburg, Německo). Výsledky byly vyjádřeny jako procento zvýšení fluorescenční intenzity na 10⁶ buněk.

4.11. Měření hladin superoxidů

Hladiny superoxidů v ovlivněných a kontrolních buňkách byly stanovovány po inkubaci ve ferri-cytochromovém roztoku (1h) a následném měření absorbance při 550 nm pomocí spektrofotometru Shimadzu UV-1601 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Německo). Koncentrace superoxidů byla vypočtena ze standardní kalibrační křivky cytochromu c a vyjádřena jako nM/mg proteinu.

4.12. Test aktivity p38 a JNK

Ovlivněné a kontrolní buněčné kultury byly převedeny do suspenze, opláchnuty roztokem PBS a koncentrovány centrifugací (600 g, 5 min, JOUAN MR 22, Trigon, Praha, Česká republika). Z buněčného peletu byl připraven celobuněčný lyzát, ve kterém byly podle pokynů výrobce stanoveny aktivity p38 a JNK pomocí ELISA reakcí specifických pro

celkovou a fosforylovanou p38 (pTpY^{180/182}) a pro celkovou a fosforylovanou JNK (pTpY^{183/183}). Testy probíhaly v 96-jamkových destičkách a data byla porovnávána se standardními křivkami získanými z příslušných standardů. Výsledky byly přepočteny na mikrogramy bílkoviny v buněčném extraktu a vyjádřeny jako poměr mezi fosforylovanou a celkovou kinázou ve vzorku. Konečné výsledky byly vyjádřeny jako procento kontrolních hodnot.

4.13. Mitochondrie: zobrazování v živých buňkách a analýza mitochondriálního transmembránového potenciálu

Buňky narostlé na krycích sklíčcích a Petriho miskách byly dle pokynů výrobce transdukovány na bakuloviru založeném kitu Organelle LightsTM Mito-GFP (Invitrogen, Česká republika). Časoběrné filmování změn v mitochondriální síti ovlivněných a kontrolních buněk bylo prováděno pomocí Olympus cell imaging station (Olympus Optical Co, Ltd., Tokyo, Japonsko) v kombinaci s invertovaným mikroskopem IX-81 vybaveným chlazenou kamerou F-View II. Filmování bylo prováděno pod kontrolou softwaru Cell a probíhalo za konstantních expozičních podmínek (jedna fotografie každých 5 min při 10 ms expozici) po dobu 48h.

Změny v mitochondriálním transmembránovém potenciálu byly sledovány v buněčných suspenzích promytých PBS a barvených JC-1 (15 min, 37°C) průtokovou cytometrií (COULTER EPICS Elite ESP, Coulter, USA). Změny v potenciálu byly měřeny jako přírůstek intenzity fluorescence při 528 nm a vyjádřeny jako procento kontroly. Alternativně byl transmembránový potenciál stanovován také pomocí mikrofluorimetru TECAN SpectraFluo Plus (TECAN Austria GmbH, Grödig, Rakousko) při kombinaci vlnových délek 485/520 nm (monomerní forma) a 520/590 nm (agregovaná forma).

4.14. Určení obsahu ATP

Změny v obsahu ATP u ovlivněných buněk byly stanovovány pomocí ATP bioluminescent assay kit (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) podle návodu výrobce. Obsah ATP vyjádřený v procentech kontroly byl vypočítán ze standardní křivky odvozené ze známých koncentrací ATP.

4.15. Příprava buněčných lyzátů

Ovlivněné a kontrolní buněčné kultury byly v různých časových intervalech převedeny pomocí roztoku trypsinu a EDTA (0,05% roztok) do suspenze, opláchnuty roztokem PBS a

centrifugovány (2 000 rpm, 5 minut, 4°C). Výsledný buněčný pelet byl použit pro přípravu celobuněčných lyzátů. Buňky byly resuspendovány v 5 ml ledového lyzačního pufru (137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% n-oktyl- β -D-glucopyranosid, 50 mM NaF, 20 mM Tris, 1 mM ortovanadan sodný a Complete TMMini) a uloženy při teplotě -20°C. Cytosolické a mitochondriální extrakty byly získány ze stejných buněk pomocí Mitochondria Fractionation Kit (Active Motif, Rixensart, Belgie). Buňky byly opakovaně promývány PBS a centrifugovány (3000 rpm, 5 min, 4°C). Po inkubaci na ledu v přítomnosti cytosolického pufru (15 min) a homogenizaci byly lyzáty dvakrát centrifugovány (3000 rpm, 15 min, 4°C) a supernatanty následně stáčeny při 20 000 rpm (20 min, 4°C). Mitochondrie byly promyty cytosolickým pufrem, lyzovány pomocí Complete mitochondria buffer, inkubovány na ledu (15 min) a vortexovány. Cytosolický supernatant byl centrifugován při 14,000 rpm (30 min, 4°C) tak, aby se odstranily reziduální mitochondrie. Obě frakce byly uloženy při teplotě -20°C.

4.16. Western blotting

Celobuněčné, mitochondriální a cytosolické lyzáty byly vařeny 5 min při teplotě 95°C v pufru SDS (Tris-HCl pH 6.81, 2-merkaptoetanol, 10% glycerol, SDS, 0.1% bromfenolová modř), a poté nanесeny na 12% SDS/polyakrylamidový gel. Každý lyzát obsahoval stejné množství bílkoviny (30 μ g – celobuněčný, 40 μ g – cytosolický, 25 μ g – mitochondriální) – stanoveno testem BCA. Po elektroforéze byly bílkoviny přeneseny na PVDF membránu (100 V, 60 min) a inkubovány při teplotě 25°C 1,5h v prostředí roztoku obsahujícího 5% odtučněné mléko, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl a 0.1% Tween 20 (TBST). Membrány byly inkubovány přes noc v přítomnosti primárních protilátek (anti-topo I, 1:700; anti-topo II α , 1:600; anti-ATM, 1:750; anti-p-ATM, 1:500; anti-BCL-2, 1:600; anti-p-H2A.X, 1:1000; anti-XIAP, 1:250; anti-survivin, 1:500; anti-HSP-27, 1:600; anti-BAX, 1:600; anti-PUMA, 1:100; anti-Noxa, 1:100; anti-p53, 1:500; anti-p-p53 (Ser-15, -46 a -392), 1:250; anti-p73, 1:100; anti-kaspáza-2, 1:200 a anti- β -aktin, 1:750) při teplotě 4°C s následnými pěti 6 min proplachy v TBST. V dalším kroku byly na bloty nanесeny sekundární protilátky konjugované s peroxidázou (1:1000, 1h, 25°C), promyty v TBST a pro jednotlivé bílkoviny specifické signály byly detekovány chemiluminescenčním (ECL) detekčním kitem (Boehringer Mannheim-Roche, Basel, Switzerland).

4.17. Exprese proteinů BAX, BCL-2, BCL-XL, MCL-1, PUMA a Noxa stanovená pomocí průtokové cytometrie

Ovlivněné a kontrolní buňky byly převedeny do suspenze pomocí trypsinizace, opláchnuty v PBS, fixovány v 4% paraformaldehydu a permeabilizovány směsí ledového metanolu/Tritonu-X v 5% BSA. Následně byly buňky inkubovány s těmito primárními protilátkami: anti-BAX 1:100; anti-BCL-2 1:100; anti-BCL-XL 1:100; anti-MCL-1 1:100; anti-PUMA 1:25 a anti-Noxa 1:50 při teplotě 4°C 1h. Po promytí vychlazeným PBS (5 min, 25°C), byly buňky inkubovány s FITC-konjugovanými kozími anti-králičími nebo anti-myšími sekundárními protilátkami (1:10, 1h, 4°C). Vzorky poté byly opláchnuty v PBS a u 30 000 buněk byly analyzovány specifické fluorescenční signály pomocí průtokového cytometru Cell Lab Quanta™ SC (Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA).

4.18. Potlačení exprese (knockdown) genu Bax

Knockdown genu Bax byl proveden pomocí SignalSilence® Pool Bax siRNA Kits podle instrukcí výrobce. Buňky byly nasazeny do 6-jamkových destiček a po dosažení cca 60% konfluence byly transfekovány specifickou siRNA proti mRNA Bax. Takto ovlivněné buňky byly 48h po poslední transfekci vystaveny inhibitorům topoizomeráz a analyzovány. Účinnost genového knockdownu byla posuzována imunoblotingovou analýzou přítomnosti proteinu Bax v ovlivněných a neovlivněných buňkách.

4.19. Detekce apoptózy

4.19.1. Průtoková cytometrie

Ovlivněné a kontrolní buňky byly převedeny do suspenze roztokem trypsinu (0,05%), promyty PBS (5 min) a fixovány v 70% etanolu při teplotě 4°C 24h. Následně byly buňky resuspendovány v roztoku obsahujícím 0.1% Triton X-100, 50 µg/ml RNázy A a 0.5 µg/ml propidium jodidu. Po inkubaci (30 min, 25°C, tma) byla pomocí průtokové cytometrie (Cell Lab Quanta™ SC, Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA) určena populace apoptotických buněk s hypodiploidní DNA.

4.19.2. Aktivita kaspáz

Ovlivněné a kontrolní buněčné kultury byly převedeny do suspenze, opláchnuty roztokem PBS a koncentrovány centrifugací (600 g, 5 min, JOUAN MR 22, Trigon, Praha, Česká republika). Buněčný koncentrát byl 20 min lyzován na ledu v prostředí lyzačního pufru (50 mM HEPES, 5 mM CHAPS a mM DTT). Lyzáty byly centrifugovány při 14 000 g, po

dobu 10 min, při teplotě 4°C, výsledný supernatant oddělen a uložen při teplotě -80°C. Kaspázová aktivita byla měřena v 96-jamkových mikrodestičkách pomocí fluorimetrické metody založené na hydrolýze fluorogenního kaspázově-specifického substrátu (VDVADAFc pro kaspázu-2, Ac-LEHD-AFC pro kaspázu-9 a DEVDAFC pro kaspázu-3, 37°C, 1h) individuálními kaspázami. Specifita enzymatické štěpné reakce byla ověřována pomocí specifických inhibitorů kaspázy-2, -9 a -3. Fluorescence byla měřena při 360/40 nm na mikrofluorimetru TECAN SpectraFluor Plus (TECAN Austria GmbH, Grödig, Rakousko). Výsledky byly vyjádřeny jako násobky zvýšené aktivity vztažené k neovlivněné kontrole.

4.19.3. Test uvolnění cytochromu c

Ovlivněné a kontrolní buňky byly v daných časových intervalech převedeny do suspenze pomocí roztoku trypsinu a za použití Mitochondria Fractionation Kit (Active Motif, Rixensart, Belgie) byly připraveny jejich cytosolické a jaderné extrakty. V těchto extraktech byl stanoven obsah cytochromu c pomocí FunctionElisaTM cytochrome c kit (Active Motif, Rixensart, Belgie). Koncentrace cytochromu c v lyzátech byla měřena při 450 nm za použití skenovacího spektrofotometru Titertek Multiscan MCC/340 (ICN Biochemicals, Frankfurt, Německo). Výsledky byly vyjádřeny jako přírůstek absorbance při 450 nm/μg lyzátu/jamku.

4.19.4 Imunofluorescenční detekce štěpení PARPu a analýza obrazu

Ovlivněné a kontrolní buněčné kultury byly fixovány 2% paraformaldehydem (20 min, 25°C), promyty PBS obsahujícím 1% Triton X (PBS-T) a blokovány v 5% roztoku BSA (30 min, 25°C). Poté byly buňky inkubovány s primární protilátkou proti rozštěpenému PARPu (1:100, 4°C, 1h). Po skončení inkubace byly buňky promyty vychlazeným PBS (5 min, 25°C) a inkubovány se sekundární protilátkou (1h, 25°C). Po konečném promytí vychlazeným PBS byla buněčná jádra dobarvena DAPI (10 μg/ml) a zamontována do SlowFade[®] media. Lokalizace a stav sledovaných markerů byla zaznamenávána epifluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 400 (Nikon Corporation, Kanagawa, Japonsko) vybaveným digitální chlazenou kamerou COOL 1300 (VDS, Vosskühler, Osnabrück, Německo). Fotografie byly pořizovány pomocí softwaru LUCIA DI Image Analysis System LIM (Laboratory Imaging Ltd., Praha, Česká republika) a analyzovány. Pro účely analýzy bylo vyhodnoceno minimálně 2000 buněk při zvětšení 200x a 600x.

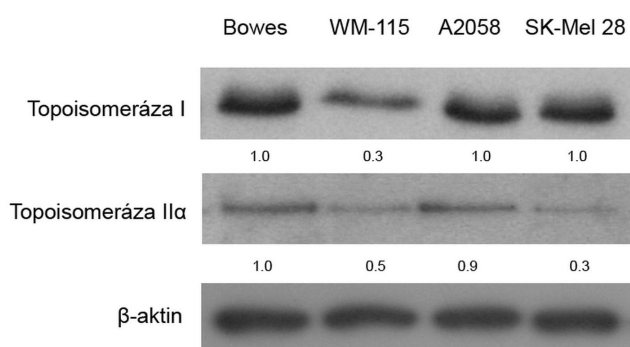
4.20. Statistické zpracování

Statistická analýza dat byla prováděna statistickým programem GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Byl použit jednocestný Anova test s následným hodnocením podle Dunetta či Bonferroniho (mnohočetný porovnávací test). Výsledky byly porovnávány s kontrolou, přičemž rozdíly byly považovány za signifikantní na hladině významnosti $P < 0,05$.

5. VÝSLEDKY

5.1. Exprese topoisomerázy I a topoisomerázy II α u modelových melanomových linií

Exprese topoisomerázy I a topoisomerázy II α byla u lidských melanomových linií Bowes, WM-115, A2053 a SK-Mel-28 stanovena pomocí Western blotingu. Jak je vidět na Obr. 5-1 u všech linií kromě WM-115 bylo detekováno významné množství proteinu topoisomerázy I. Exprese topoisomerázy II α byla ve stejných liniích v porovnání s topoisomerázou I nižší a jednotlivé linie se také více odlišovaly v úrovni exprese. Nejvíce byl tento enzym exprimován u linií Bowes a A2058, významně nižší množství tohoto proteinu bylo zaznamenáno u linií WM-115 a SK-Mel 28.

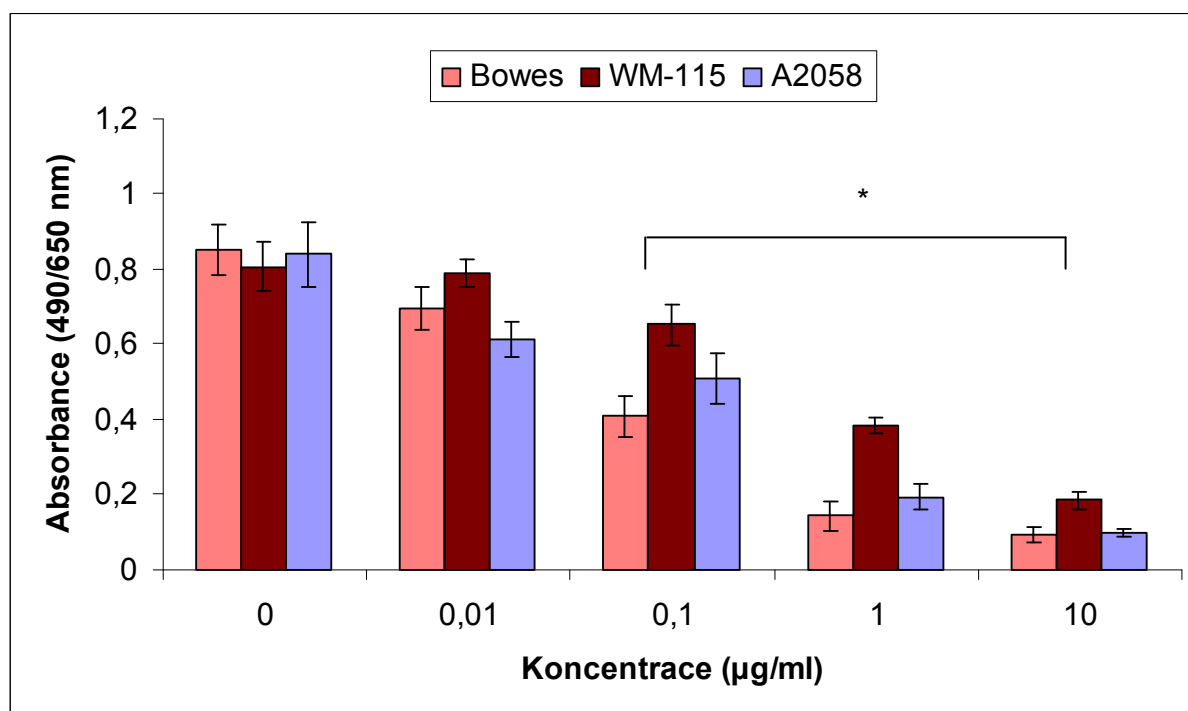


Obr. 5-1 Western blottingová analýza exprese u lidských melanomových linií Bowes, WM-115, A2058 a SK-Mel 28. Nanášky proteinů byly normalizovány k β -aktinu a kvantifikace proužků byla provedena softwarem GelQuant Ver 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Izrael). Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů.

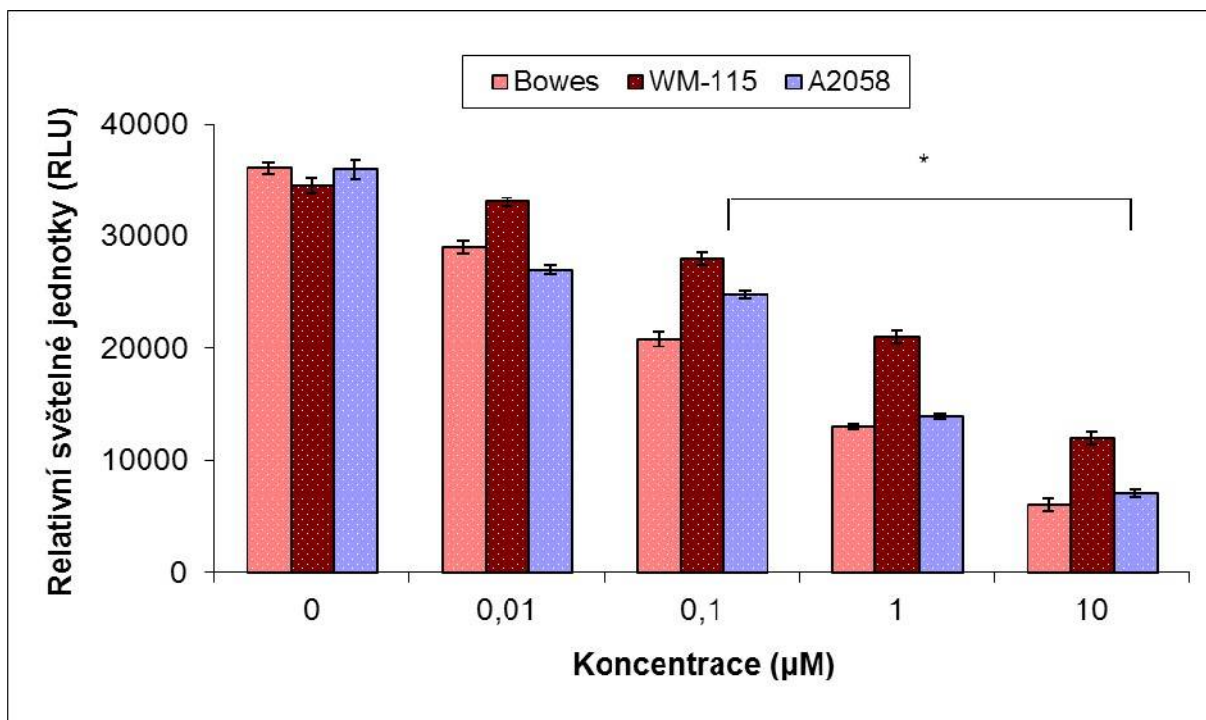
5.2. Cytotoxicita a proapoptotická aktivita kamptotecinu na melanomových buňkách

Cytotoxický a antiproliferační účinek kamptotecinu byl ověřován na tří lidských melanomových liniích s nemutovaným genem p53 během 24h působení, a to pomocí dvou testů: WST-1 s Coomassie Brilliant Blue a DNA syntézy. Oba použité testy shodně prokázaly, že kamptotecin snížil viabilitu a proliferaci u všech testovaných linií v závislosti na použité dávce. Nicméně u vyšších použitých koncentrací (0,1-10 μ g/ml), které byly významně cytotoxické v porovnání s kontrolními kulturami, se projevila odlišná citlivost jednotlivých buněčných linií, kdy jako nejcitlivější se ukázala buněčná linie Bowes a nejméně citlivá linie WM-115 (Obr. 5-2A a 5-2B). Podobné výsledky poskytly i testy hodnotící schopnost kamptotecinu indukovat na dávce závislou apoptózu. (Obr. 5-2C). Protože se rozdíly v odpovědi jednotlivých linií na kamptotecin projevily nejvýrazněji při koncentraci 1 μ g/ml, byla tato koncentrace použita pro další testování. Jak je patrné z Obr. 5-2D, aktivita kaspázy-9 a kaspázy-3 byla po ovlivnění kamptotecinem u linie WM-115 výrazně nižší než u linií

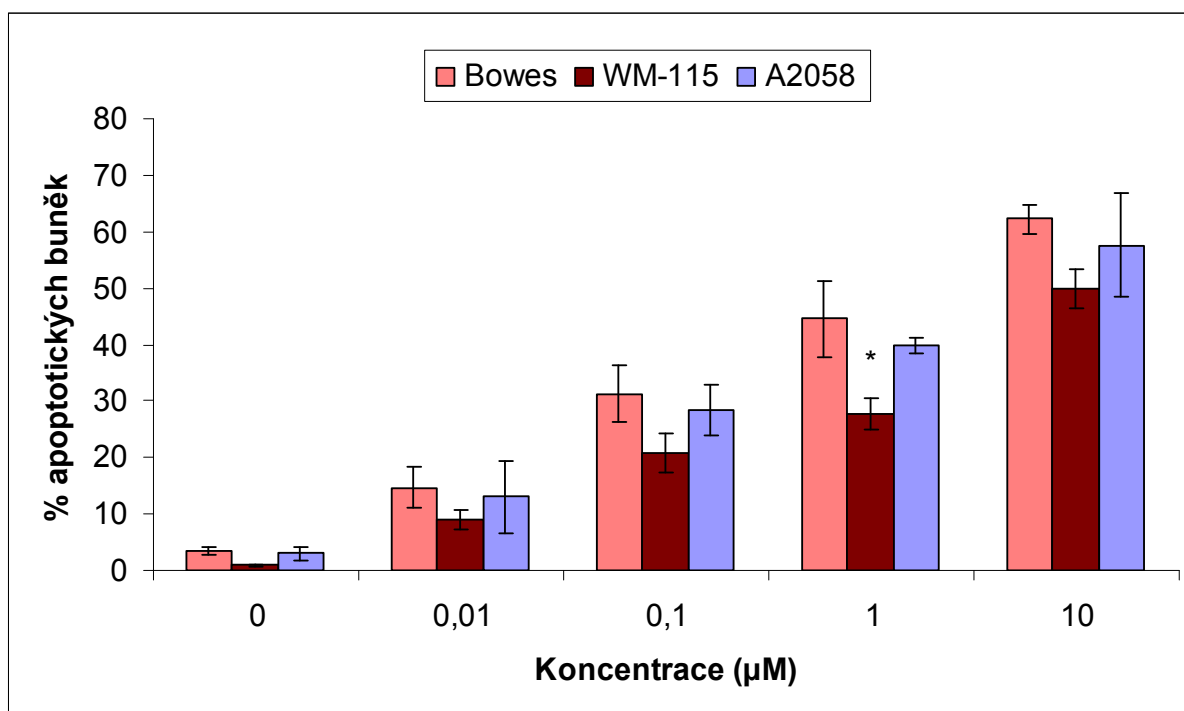
Bowes a A2058, jak bylo dále prokázáno i na specifickém profilu štěpení PARPu u studovaných melanocytů (Obr. 5-2E).



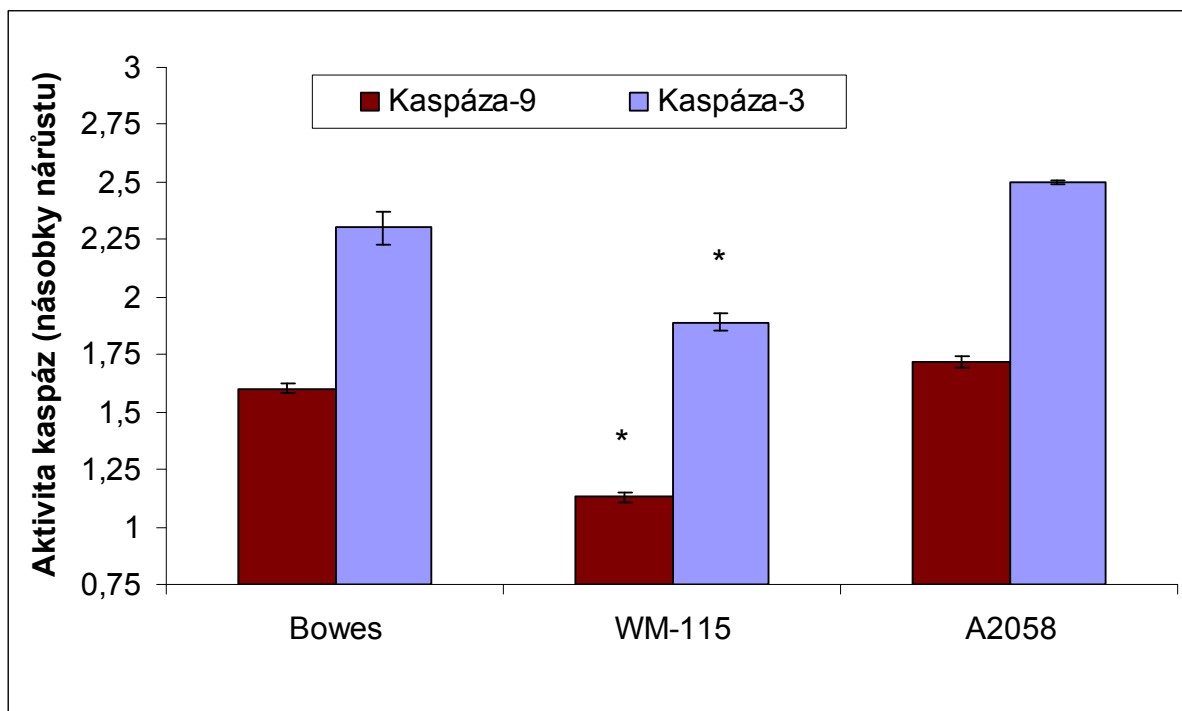
Obr. 5-2A Cytotoxicita kamptotecinu testovaná na lidských melanomových liniích Bowes, WM-115 a A2058 v intervalu 24h pomocí WST-1 testu. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolou pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



Obr. 5-2B Cytotoxicita kamptotecinu testovaná na lidských melanomových liniích Bowes, WM-115 a A2058 v intervalu 24h pomocí inkorporace značeného BrdU. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tři nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolou pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



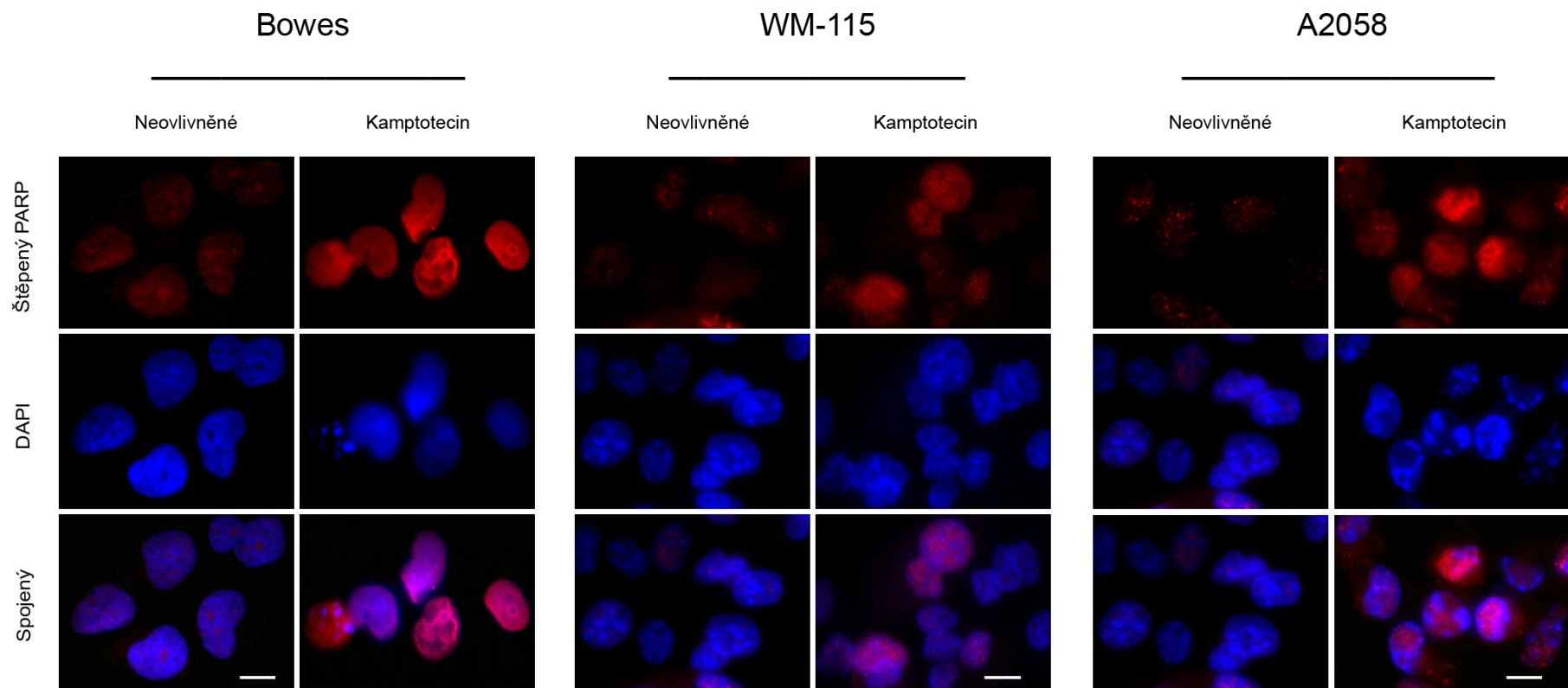
Obr. 5-2C Kvantifikace apoptózy indukované kamptotecinem u lidských melanomových linií Bowes, WM-115 a A2058 v intervalu 24h pomocí metody průtokové cytometrie. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tři nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s ostatními liniemi ovlivněnými stejnou koncentrací kamptotecinu ve stejném časovém intervalu pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



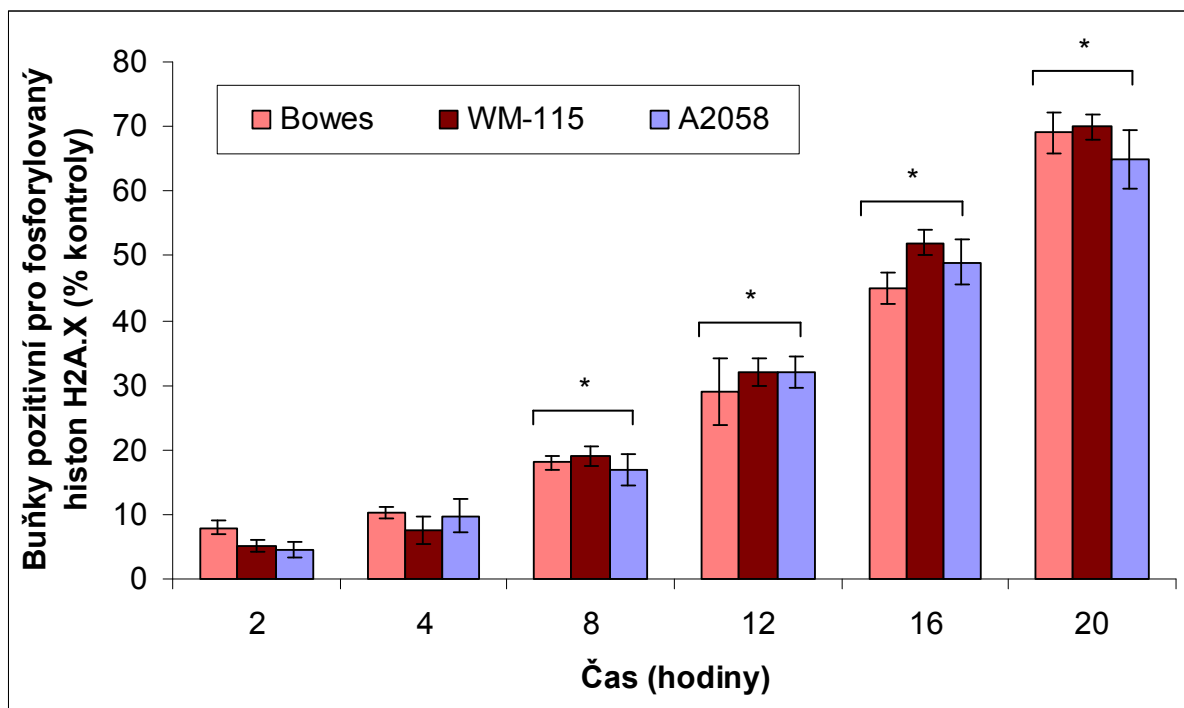
Obr. 5-2D Změny aktivity kaspázy-9 a kaspázy-3 u lidských melanomových linií Bowes, WM-115 a A2058 ovlivněných kamptotecinem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s ostatními liniemi ovlivněnými stejnou koncentrací kamptotecinu ve stejném časovém intervalu pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

5.3. Kamptotecinem vyvolané poškození DNA a aktivace signálních drah u melanomových buněk

Vzhledem k mechanismu účinku kamptotecinu (inhibitor topoisomerázy I) byla v následujícím kroku sledována kinetika poškození DNA a aktivace specifických signálních drah. Poškození DNA bylo u melanomových linií vystavených kamptotecinu o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ stanovováno mikrofluorimetricky prostřednictvím detekce exprese fosforylovaného histonu H2A.X. Přítomnost tohoto markeru byla zvýšená u všech linií již po 8h ovlivnění kamptotecinem a během dalších hodin dále stoupala (Obr. 5-3A). Morfologicky byl fosforylovaný histon H2A.X přítomen v jádru buněk v typických ohniscích (foci) kolokalizujících s dalšími molekulami odpovědnými za detekci, rozpoznávání a signalizaci DNA poškození (jako např. fosforylovaná ATM kináza). Následná buněčná odpověď na kamptotecinem stimulované poškození DNA, a to zejména v souvislosti s genem tp53, byla studována metodou Western blotingu.



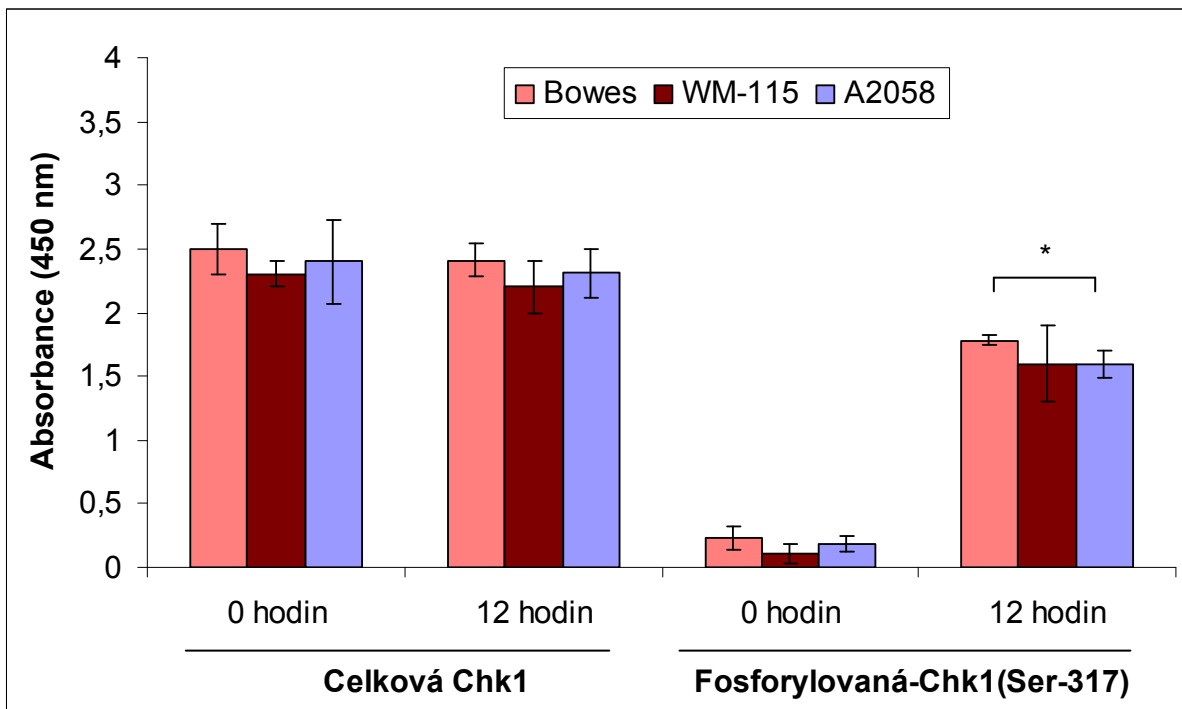
Obr. 5-2E Imunofluorescenční detekce štěpeného PARPu a kondenzovaného jaderného chromatinu u lidských melanomových linií ovlivněných kamptotecinem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 20h. Fluorescenční mikroskopie, zvětšení 600x. Měřítko 5 μm . Fotografie představují výsledky tří nezávislých pokusů.



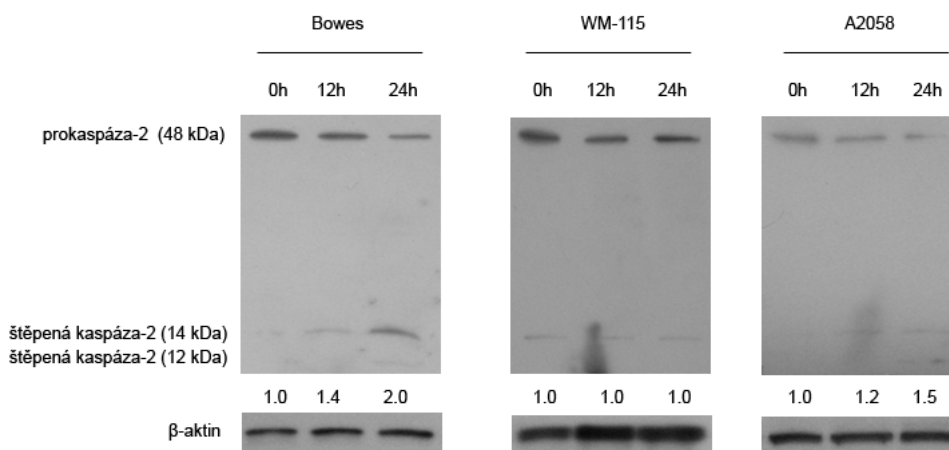
Obr. 5-3A Kinetika exprese fosforylovaného histonu H2A.X jako senzoru poškozené DNA u lidských melanomových linií Bowes, WM-115 a A2058 ovlivněných kamptotecinem v koncentraci 1 µg/ml v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů. *P<0,05 v porovnání s ostatními liniemi ovlivněnými stejnou koncentrací kamptotecinu během 2h pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



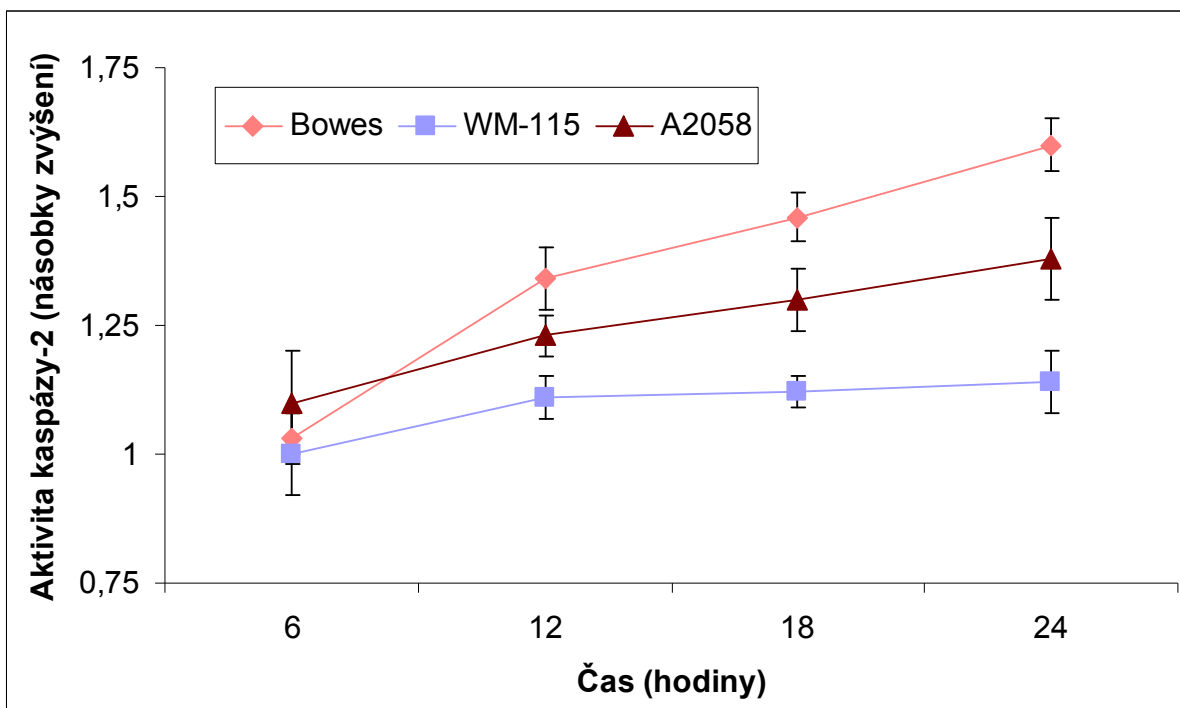
Obr. 5-3B Western blottingová analýza aktivace na poškození DNA-závislé signální dráhy u lidských melanomových linií Bowes, WM-115 a A2058 ovlivněných kamptotecinem v koncentraci 1 µg/ml v intervalu 24h. Nanášky proteinů byly normalizovány k β-aktinu a kvantifikace proužků byla provedena softwarem GelQuant Ver 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Izrael). Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů.



Obr. 5-3C Fosforylace (aktivace) Chk1 u lidských melanomových linií Bowes, WM-115 a A2058 ovlivněných kamptotecinem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 12h pomocí ELISA testu. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tři nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s počátkem ovlivnění pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



Obr. 5-3D Western blottingová analýza aktivace kaspázy-2 u lidských melanomových linií Bowes, WM-115 a A2058 ovlivněných kamptotecinem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Použitá protilátka rozpoznává jak endogenní hladiny prokaspázy-2 tak její štěpné fragmenty 14 a 12 kDa. Nanášky proteinů byly normalizovány k β -aktinu a kvantifikace proužků byla provedena softwarem GelQuant Ver 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Izrael). Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tři nezávislých pokusů.

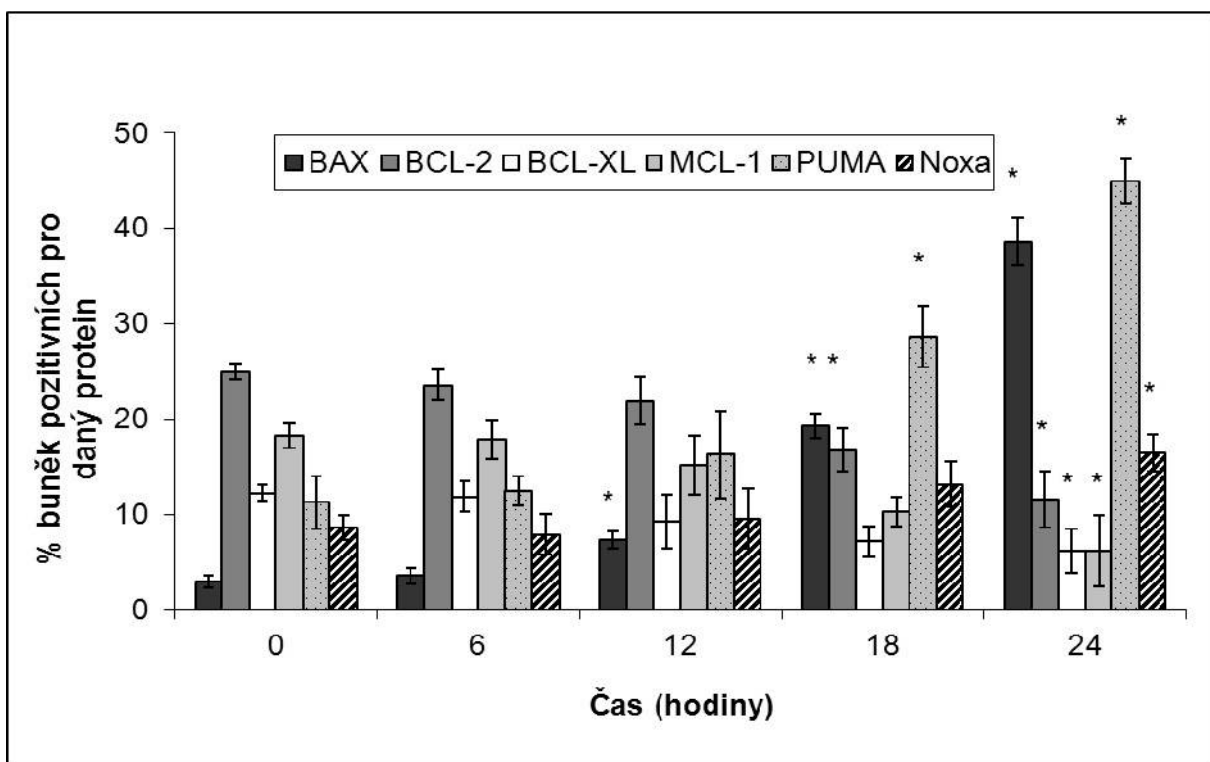


Obr. 5-3E Porovnání aktivity kaspázy-2 u lidských melanomových linií Bowes, WM-115 a A2058 ovlivněných kamptotecinem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tři nezávislých pokusů.

Tato analýza prokázala, že s výjimkou linie WM-115, melanocyty zvyšovaly expresi proteinu p53 v závislosti na celkové době působení cytostatika a specificky fosforylovaly protein p53 na pozici Ser-15. Naopak, fosforylace dalších specifických míst na proteinu p53 – Ser-43 a Ser-392 nebyla detekována. Kromě změn v expresi genu p53 bylo dále v melanocytech zjištěno zvýšené množství proteinu p73, a to opět pouze u buněk linie Bowes a A2058 (Obr. 5-3B). Vzhledem k funkční závislosti mezi expresí p73 a aktivitou specifické kontrolní kinázy (checkpoint kinase 1 (Chk1)), byl pro ověření tohoto vztahu proveden ELISA test aktivity Chk1. Výsledky tohoto testu ukazují, že kamptotecin silně aktivuje Chk1, a to prostřednictvím fosforylace její molekuly na pozici Ser-317 u všech melanomových linií (Obr. 5-3C). Další testy se následně zaměřily také na jedinou kaspázu, která se lokalizuje do buněčného jádra a která má přímý vztah k pošlazení DNA. Western blottingová analýza stejně jako test aktivity kaspázy-2 u melanomových buněk ovlivněných kamptotecinem prokázaly aktivaci tohoto enzymu, nicméně opět pouze u buněk Bowes a A2058 (Obr. 5-3D a E).

5.4. Vliv kamptotecinu na expresi proteinů rodiny BCL-2 melanomových buněk

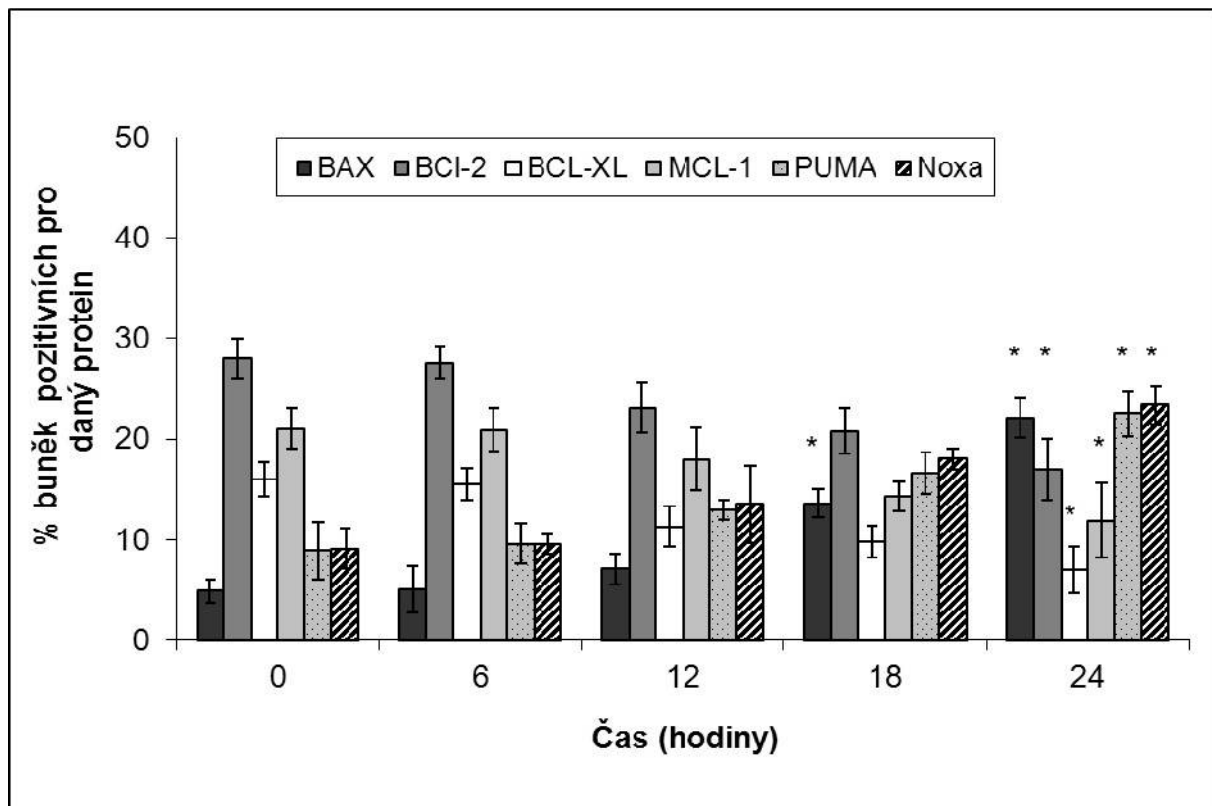
Vzhledem k výsledkům předchozích pokusů, které u melanomových buněk prokázaly kamptotecinem vyvolanou aktivaci signálních stresových drah spolu s úlohou genu p53, byly v další fázi zkoumány expresní profily genů, které jsou genem p53 regulovány pozitivně (BAX, Noxa, PUMA) nebo negativně (BCL-2, BCL-XL nebo MCL-1). U buněk linie Bowes došlo v pozdějších intervalech ovlivnění (18-24h) k významné redukci exprese proteinů BCL-2, BCL-XL a MCL-1, zatímco exprese proteinů BAX a PUMA ve stejném intervalu významně vzrostla. Podobný, ale nižší nárůst exprese byl pozorován i u proteinu Noxa. (Obr. 5-4A).



Obr. 5-4A Exprese proteinů BAX, BCL-2, BCL-XL, MCL-1, PUMA a Noxa u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné kamptotecinem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tři nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s počátkem ovlivnění pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

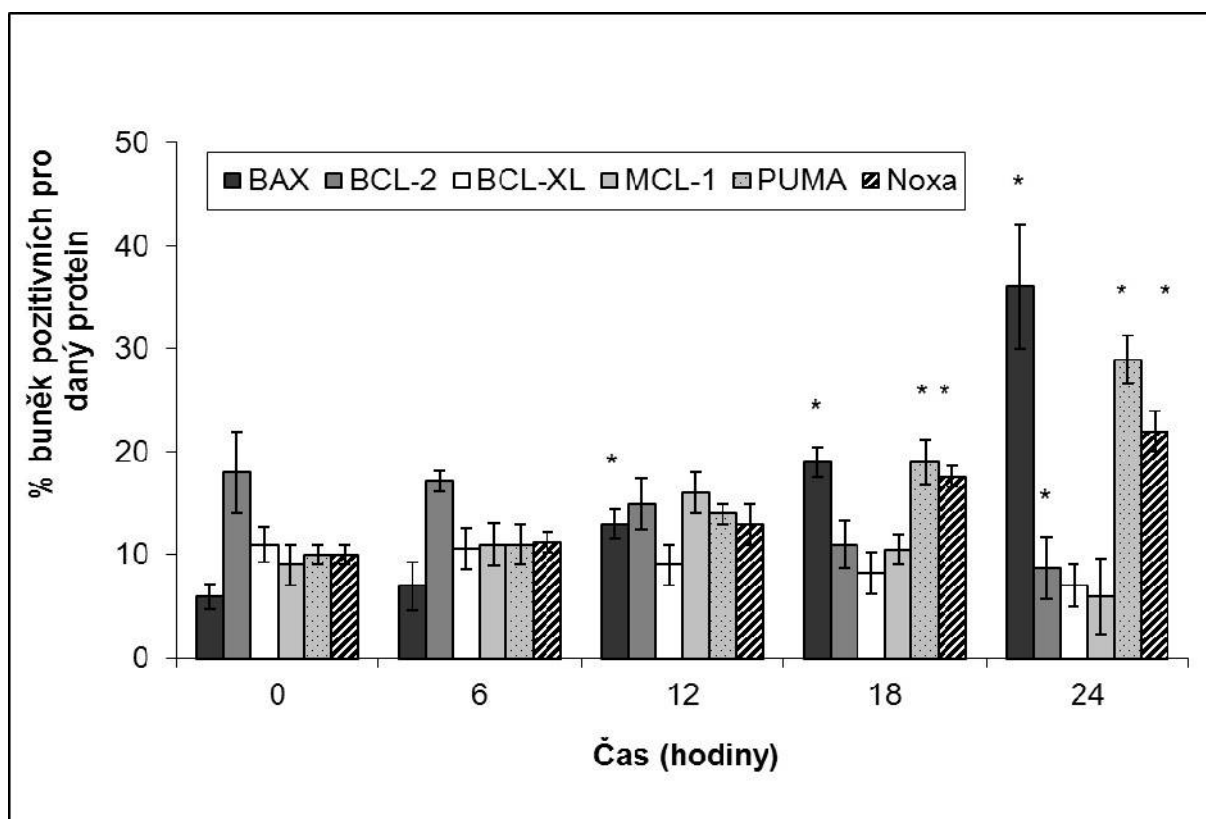
U buněk linie WM-115 se exprese všech studovaných antiapoptotických proteinů v čase snižovala, ale statistické významnosti dosáhla až na konci celého pokusu (24h). Podobný, ale opačný trend byl pozorován u proapoptotických proteinů, i když v tomto případě jejich exprese byla v porovnání s linií Bowes daleko nižší a v případě proteinů Puma a Noxa statisticky nevýznamná (Obr. 5-4B). Výsledky získané z buněk linie A2058 byly obecně

podobné výsledkům pozorovaným u linie Bowes. Jediná odlišnost se týkala významného snížení exprese genu BCL-2 oproti expresi genů BCL-XL a MCL-1. Kromě toho byl na konci pokusu (24h) pozorován i méně významný rozdíl v expresi genů Puma a Noxa (Obr. 5-4C).

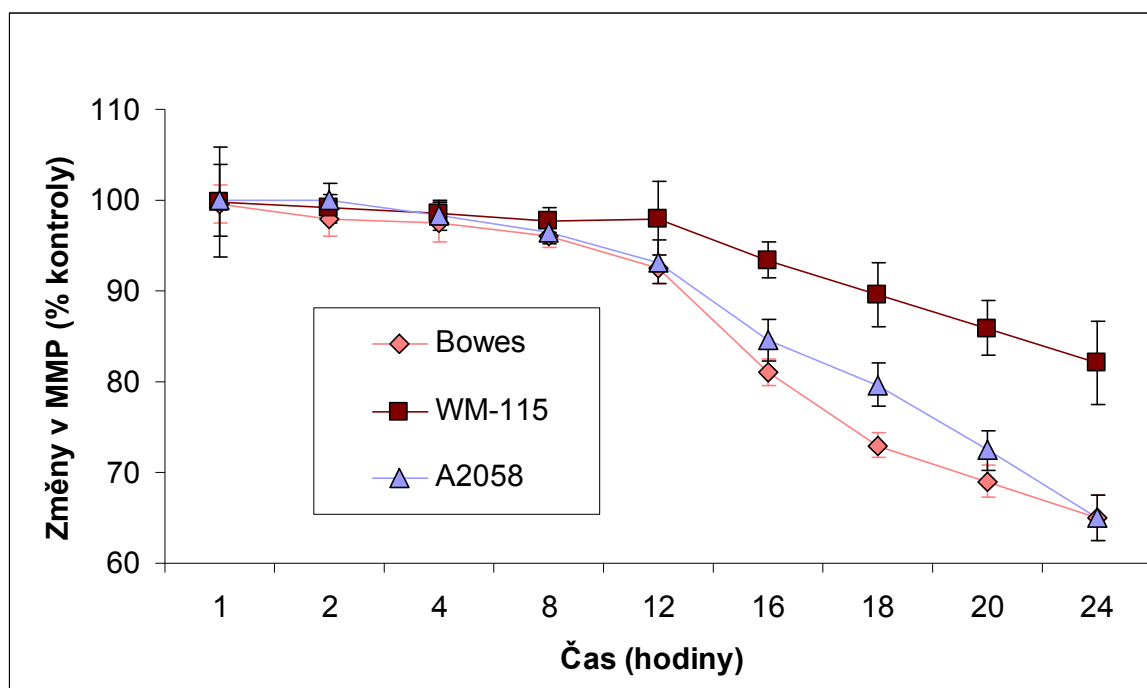


Obr. 5-4B Expresa proteinů BAX, BCL-2, BCL-XL, MCL-1, PUMA a Noxa u lidské melanomové linie WM-115 ovlivněné kamptotecinem v koncentraci 1 µg/ml v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů. *P<0,05 v porovnání s počátkem ovlivnění pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

Protože jsou změny v expresi genů rodiny BCL-2 spojovány se ztrátou mitochondriálního potenciálu, která je nezbytnou podmínkou pro zvýšenou permeabilitu vnější mitochondriální membrány a následné uvolnění kaspázy-aktivujících molekul, byla u kamptotecinem ovlivněných buněk sledována aktivita mitochondrií pomocí potenciálově sensitivní fluorescenční sondy JC-1. Významnější redukce membránového potenciálu byla u buněk linie Bowes a A2058 pozorovatelná již po 8h ovlivnění a k jejímu signifikantnímu nárůstu došlo následně mezi 12 a 16h od začátku ovlivnění. Naopak u buněk linie WM-115 došlo k významnějšímu omezení mitochondriální aktivity až v intervalu 18-24h, přičemž pokles potenciálu byl daleko pozvolnější (Obr. 5-4D).



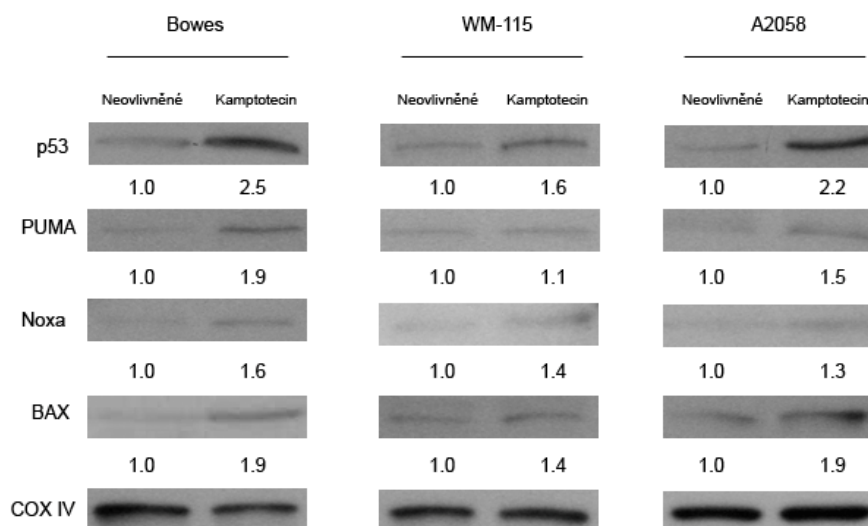
Obr. 5-4C Expres proteinů BAX, BCL-2, BCL-XL, MCL-1, PUMA a Noxa u lidské melanomové linie A2058 ovlivněné kamptotecinem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tři nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s počátkem ovlivnění pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



Obr. 5-4D Kinetika změn v mitochondriálním membránovém potenciálu (MMP) u lidských melanomových linií Boves, WM-115 a A2058 ovlivněných kamptotecinem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tři nezávislých pokusů.

5.5. Vliv kamptotecinu na mitochondrie melanomových buněk

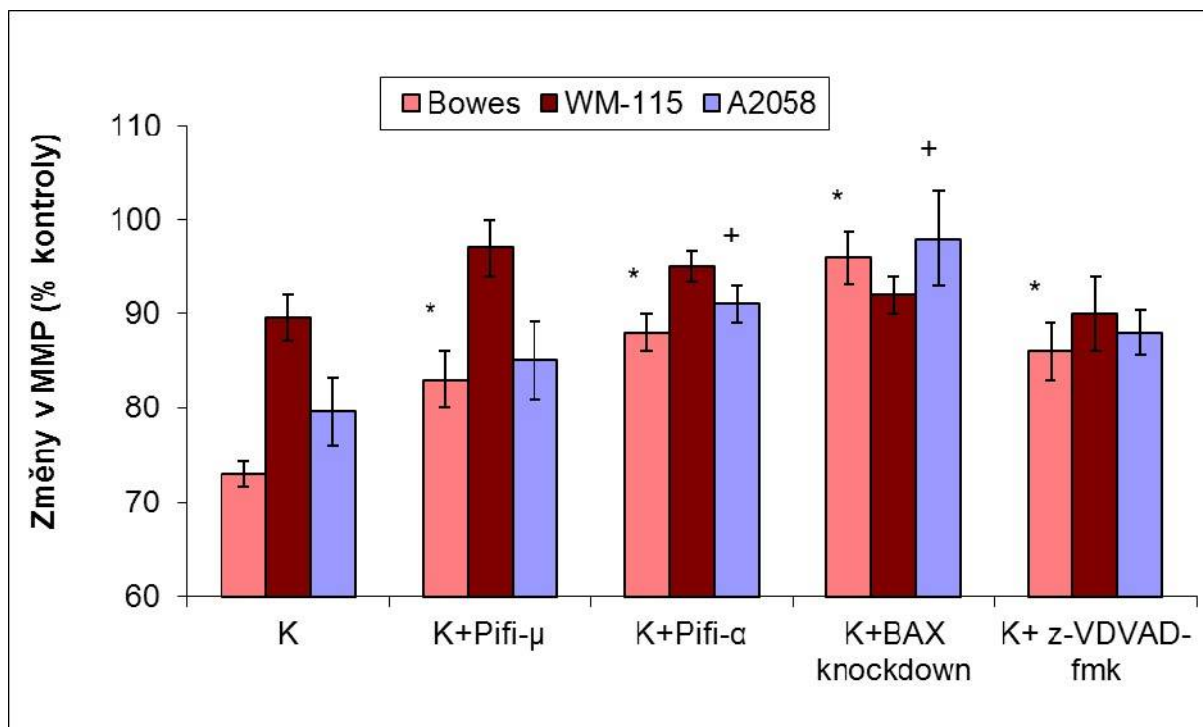
Ztráta mitochondriálního potenciálu a uvolnění apoptózu-aktivujících mediátorů z mitochondriálního cytosolu mohou být vyvolány změnou exprese genů rodiny BCL-2 (jak bylo prokázáno v předchozích experimentech), které tvoří komplexy s proteinem p53 či jeho transaktivovanými cílovými genovými produkty. Western blotting a analýza mitochondriálních kompartmentů u všech použitých melanomových linií vystavených vlivu kamptotecinu během 20h prokázaly zvýšenou akumulaci proteinů p53 a BAX, i když opět u buněk linie WM-115 v menší míře. Translokace proteinu Noxa byla u všech sledovaných linií slabší a protein PUMA nebyl v mitochondriích buněk linie WM-115 nalezen vůbec (Obr. 5-5A).



Obr. 5-5A Western blottingová analýza translokace p53, BAX, Noxa a PUMA do mitochondrií u lidských melanomových linií Bowes, WM-115 a A2058 ovlivněných kamptotecinem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 20h. Nanášky proteinů byly normalizovány k β -aktinu a kvantifikace proužků byla provedena softwarem GelQuant Ver 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Izrael). Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů.

S cílem určit relativní podíl výše zmíněných mechanismů na ztrátu mitochondriálního potenciálu u melanomových buněk vystavených vlivu kamptotecinu byly u testovaných buněčných linií použity specifické chemické inhibitory vybraných molekul, včetně technologie siRNA. Inhibitor p53 – Pifitrin- α zabránil kamptotecinem indukované ztrátě mitochondriálního potenciálu u všech studovaných melanomových linií, avšak tento preventivní vliv byl signifikantní pouze u buněk linií Bowes a A2058. Pifitrin- μ , který selektivně inhibuje translokaci proteinu p53 do mitochondrií, byl účinný pouze u buněk linie

Bowes. Stejně výsledky poskytla i inhibice kaspázy-2. Knockdown genu Bax zabránil kamptotecinem indukované ztrátě mitochondriálního potenciálu u buněk linií Bowes a A2058. Žádný z použitých inhibitorů ani genový knockdown významně nepotlačil kamptotecinem vyvolanou ztrátu mitochondriálního potenciálu u buněk linie WM-115, ačkoliv inhibice translokace proteinu p53 do mitochondrií měla v tomto ohledu měřitelný účinek (Obr. 5-5B).

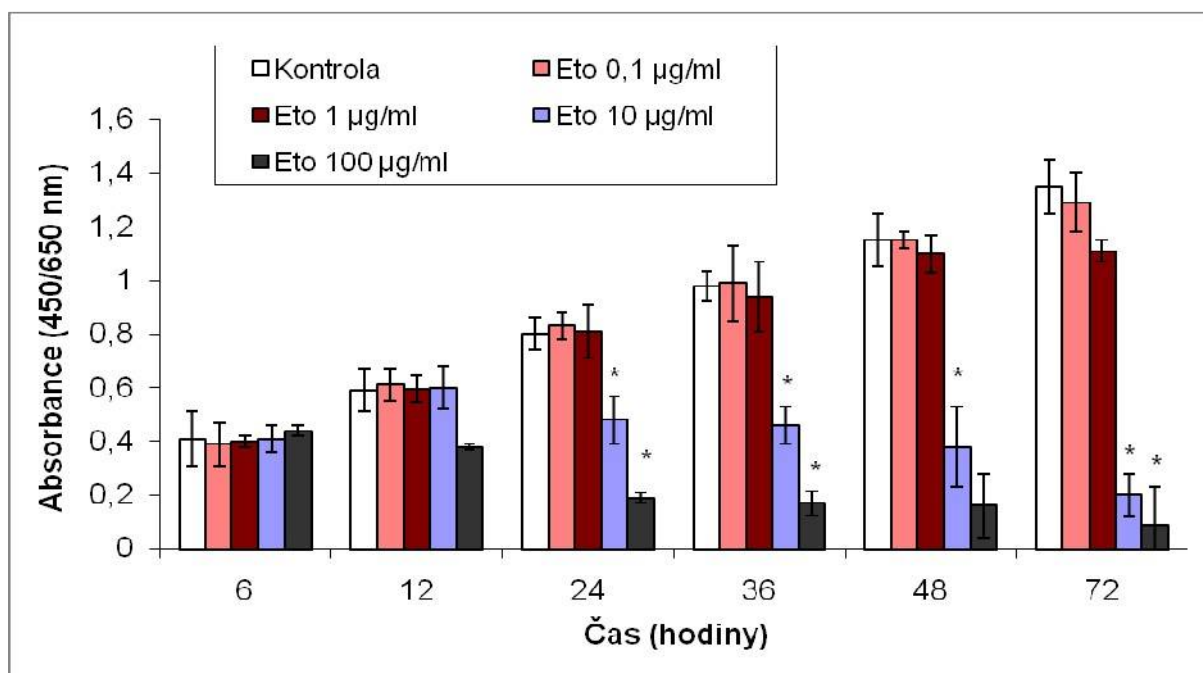


Obr. 5-5B Účinek inhibitorů a genového knockdownu na kamptotecinem (K - 1 μg/ml) vyvolanou ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) u lidských melanomových linií Bowes, WM-115 a A2058 v intervalu 24h. V daný časový interval před ovlivněním kamptotecinem (viz Materiál a metodiky) byly k buňkám přidány inhibitory p53 (Pifitrin-α – Pifi-α, Pifitrin- μ – Pifi-μ) a kaspázy-2 (z-VDVAD-fmk) popřípadě byl v buňkách proveden knockdown exprese genu Bax. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tři nezávislých pokusů. *P<0,05 v porovnání s buňkami Bowes ovlivněnými kamptotecinem +P<0,05 v porovnání s buňkami A2058 ovlivněnými kamptotecinem pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

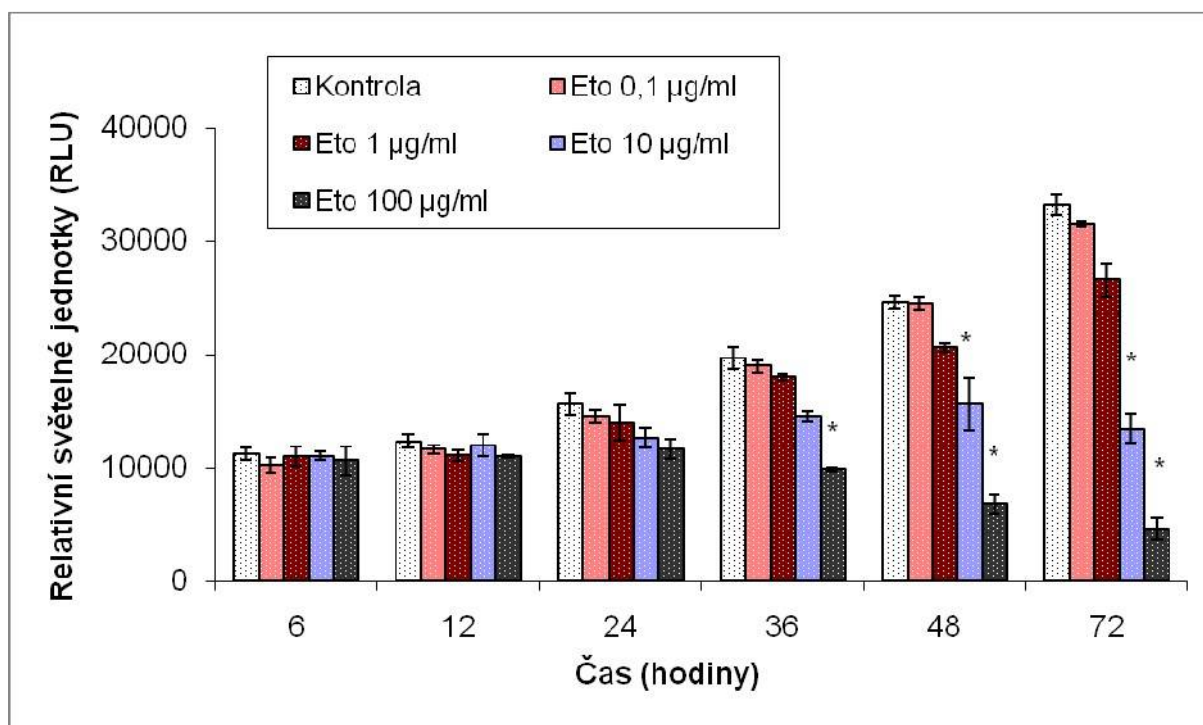
5.6. Cytotoxicita a proapoptická aktivita etoposidu na melanomových buňkách

Cytotoxicita etoposidu byla ověřována na melanomové linii Bowes v průběhu 72h expozice, a to pomocí WST-1 testu s korelací na obsah proteinů (Coomassie Brilliant Blue) a testu inkorporace BrdU. Podobně jako kamptotecin také etoposid inhiboval růst melanomových buněk linie Bowes v časové a koncentrační závislosti, přičemž signifikantní inhibice růstu

buněk byla pozorována pouze u nejvyšších použitých koncentrací, tj. 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 5-6A a B).

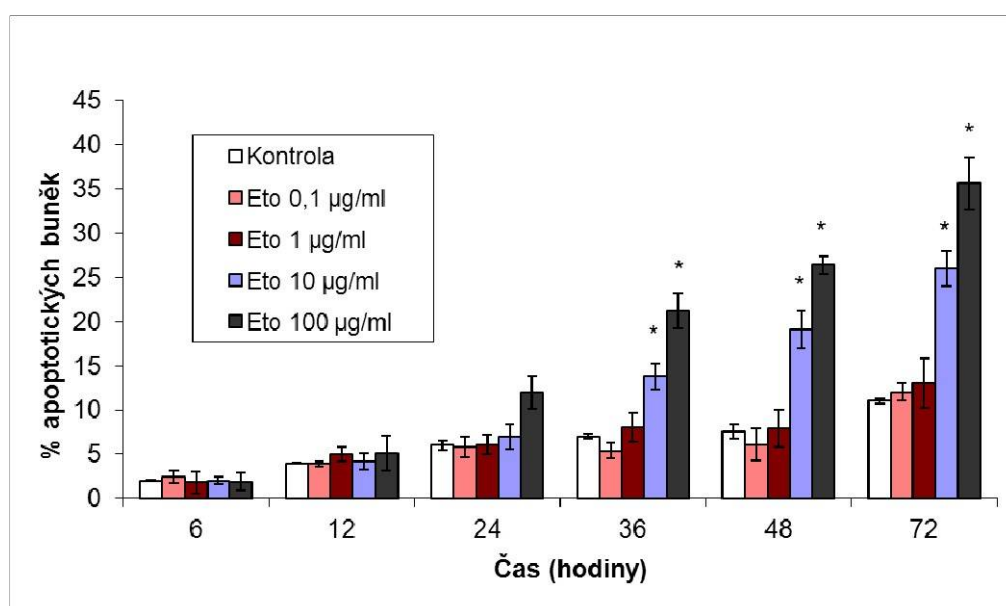


Obr. 5-6A Cytotoxicita etoposidu testovaná na lidské melanomové linii Bowes v intervalu 72h pomocí WST-1 testu. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolou pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

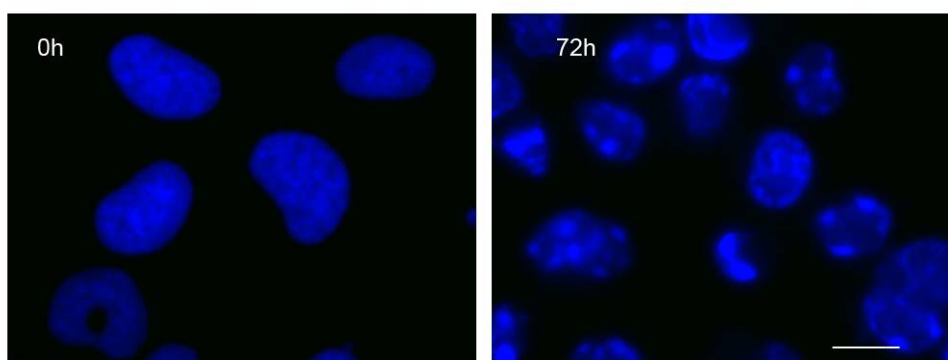


Obr. 5-6B Cytotoxicita etoposidu testovaná na lidské melanomové linii Bowes v intervalu 72h pomocí inkorporace značeného BrdU. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolou pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

Zjištěná cytotoxicita etoposidu u buněk linie Bowes byla dále studována ve vazbě ke konečnému osudu ovlivňovaných buněk. V tomto případě tedy k možné aktivaci buněčné smrti – apoptózy. Použité testy prokázaly, že v populaci ovlivňovaných buněk se již 24h od začátku pokusu zvyšovalo množství buněk s obsahem hypodiploidní DNA a jejich počet plynule narůstal až do konce pokusu (Obr. 5-6C). Apoptotické buňky vykazovaly typické morfologické znaky programované buněčné smrti, a to zejména změněnou architekturu jádra s typickou kondenzací a marginalizací chromatinu a následnou tvorbou apoptotických tělísek (Obr. 5-6D).



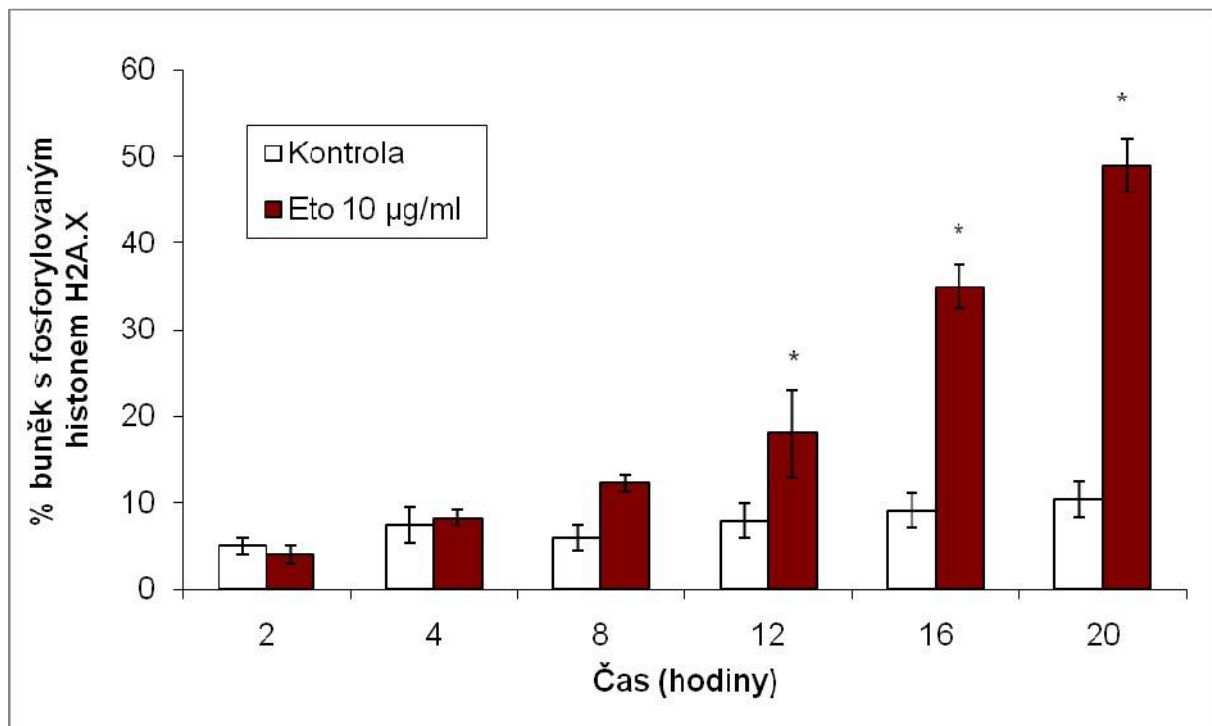
Obr. 5-6C Apoptóza indukovaná etoposidem u lidské melanomové linie Bowes v intervalu 72h pomocí měření obsahu buněk s hypodiploidní DNA. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tři nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolou pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



Obr. 5-6D Apoptóza indukovaná etoposidem u lidské melanomové linie Bowes v intervalu 72h. Fluorescenční mikroskopie, zvětšení 600x. Měřítko 5 μ m. Fotografie představují výsledky tří nezávislých pokusů.

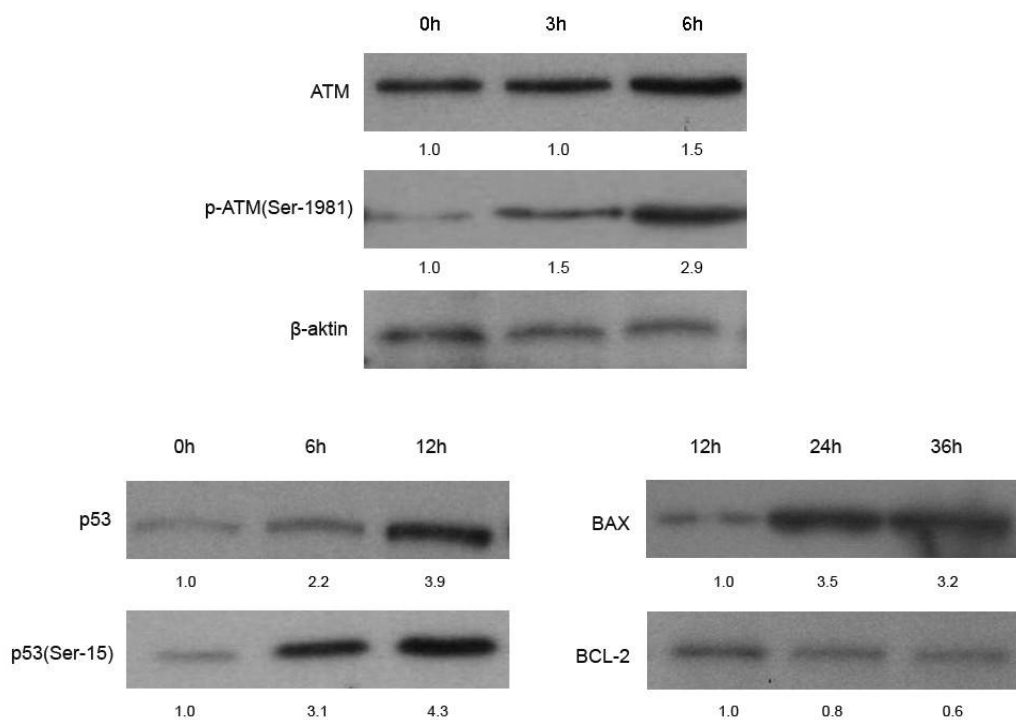
5.7. Etoposidem vyvolané poškození DNA a aktivace na p53 závislé signální dráhy u melanomových buněk

Podobně jako kamptotecin i etoposid působí primárně na DNA cílových buněk. Poškození DNA a její kinetika byla v tomto případě sledována pomocí exprese senzoru poškození DNA – fosforylovaného histonu H2A.X. Analýzy exprese tohoto proteinu prokázaly, že etoposid vyvolává časné změny v genetickém aparátu exponovaných buněk (statisticky významná exprese histonu byla patrná v buňkách Bowes již po 12h od začátku ovlivnění) (Obr. 5-7A). Na druhé straně z morfologických analýz vyplývá, že povaha poškození DNA byla v tomto případě poněkud odlišná od kamptotecinem navozených změn, což bylo patrné zejména při mikroskopických studiích lokalizace, počtu a charakteru exprese histonu v jádrech buněk.



Obr. 5-7A Kinetika exprese fosforylovaného histonu H2A.X jako senzoru poškozené DNA u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 10 µg/ml v intervalu 20h. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů. *P<0,05 v porovnání s kontrolními kulturami pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

Etoposidem navozené poškození DNA vyvolalo u melanomových buněk Bowes aktivaci specifické signální dráhy zahrnující ATM kinázu, jejíž exprese se zvyšovala již po 6h

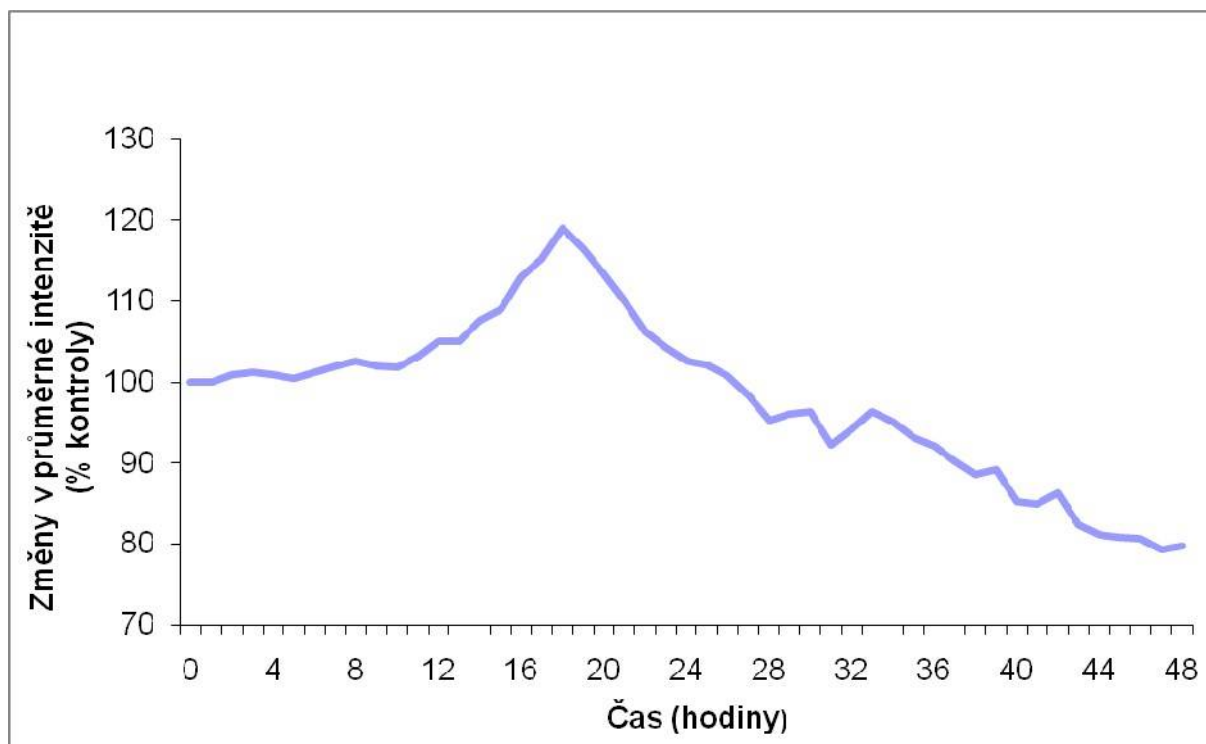


Obr. 5-7B Western blottingová analýza aktivace na poškození DNA-závislé signální dráhy u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 10 µg/ml v intervalu 36h. Nanášky proteinů byly normalizovány k β-aktinu a kvantifikace proužků byla provedena softwarem GelQuant Ver 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Izrael). Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů.

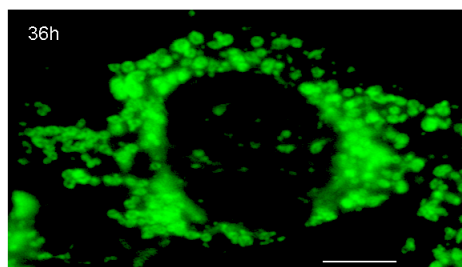
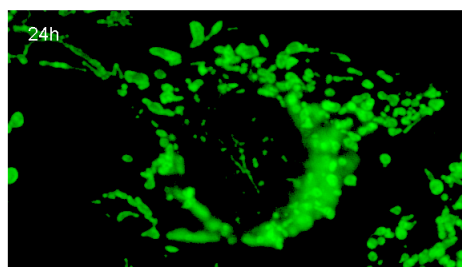
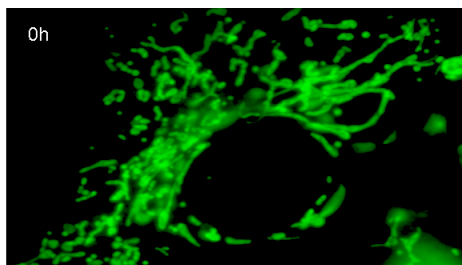
expozice k etoposidu a byla doprovázena specifickou fosforylací tohoto proteinu na pozici Ser-1981. Následně došlo ke zvýšení exprese genu tp53 a zvyšovala se také koncentrace proteinu p53 fosforylovaného na pozici Ser-15. Tento proces byl doprovázen pozdějším masivním zvýšením koncentrace proapoptického proteinu BAX a poklesem koncentrace antiapoptického proteinu BCL-2 (Obr. 5-7B).

5.8. Přímý vliv etoposidu na mitochondrie melanomových buněk

Vzhledem k publikovaným studiím a multicentrickému působení etoposidu na cílové buňky byl zkoumán také jeho potenciální přímý vliv na funkci mitochondrií. Pomocí časosběrné fluorescenční mikroskopie a pokročilé analýzy obrazu buněk Bowes s GFP-označenými



Obr. 5-8A Změny v dynamice mitochondrií u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 48h. Měřeno na stanici Olympus cell[®]. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů.

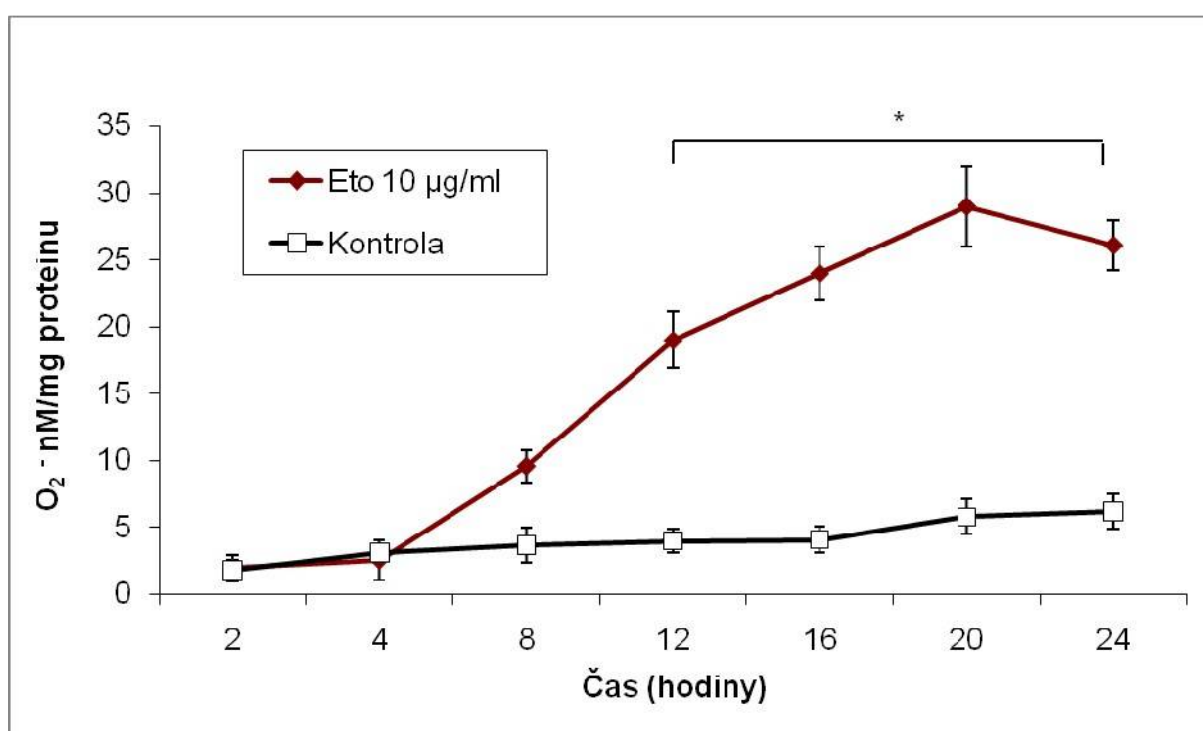


mitochondriemi bylo zjištěno, že během prvních 12h ovlivnění etoposidem se mitochondriální síť neměnila, a to jak z hlediska jejich tvaru tak dynamiky. Naopak zpočátku docházelo spíše k nárůstu fluorescenční intenzity zkoumaných buněk, což svědčilo spíše o vzrůstající mase mitochondriální sítě. Tento trend pokračoval zhruba do 20h od počátku ovlivnění, aby poté došlo k významnému

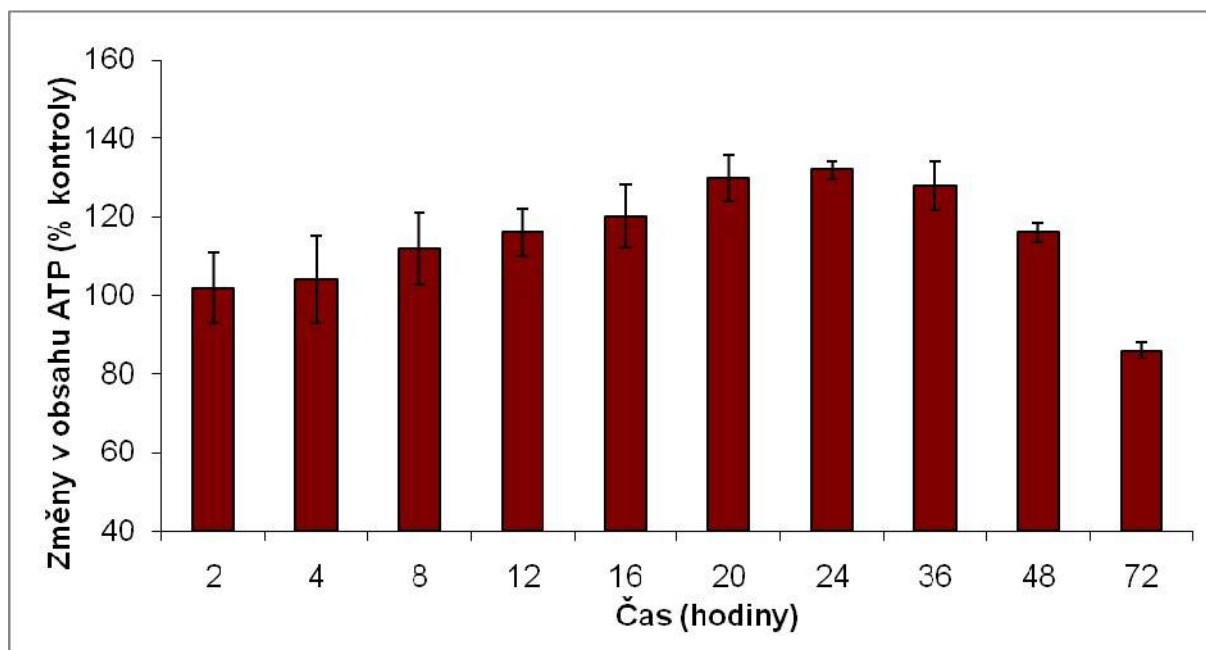
Obr. 5-8B Dynamické změny mitochondrií označených Organelle Lights[™] Mito-GFP v melanomových buňkách Bowes po ovlivnění etoposidem v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 48h. Měřeno na stanici Olympus cell[®]. Zvětšení 600x. Měřítko 5 μm . Fotografie představují výsledky tří nezávislých pokusů.

obratu a fluorescenční intenzita prudce klesala (Obr. 5-8A). Tato změna korespondovala mikroskopicky se změnou tvaru a lokalizace mitochondrií, které se měnily z vláknitých na stočené až shloučené útvary hromadící se v perinukleární oblasti. Mitochondrie se také vyznačovaly změnou dynamiky pohybu (Obr. 5-8B).

Změny v chování a morfologie mitochondrií ovlivněných melanomových buněk byly v dalším kroku korelovány s funkčními analýzami buněčné produkce ATP a superoxidového radikálu. Obě tyto analýzy prokázaly, že během prvních 20h po ovlivnění etoposidem se produkce ATP stejně jako superoxidového radikálu zvyšovala, a k jejich významnému poklesu došlo až během pozdějších intervalů ovlivnění, což korespondovalo s pozorovanou inhibicí dynamiky těchto organel (Obr. 5-8C a D).



Obr. 5-8C Kinetika produkce superoxidového radikálu u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 10 µg/ml v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů. *P<0,05 v porovnání s kontrolními kulturami pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

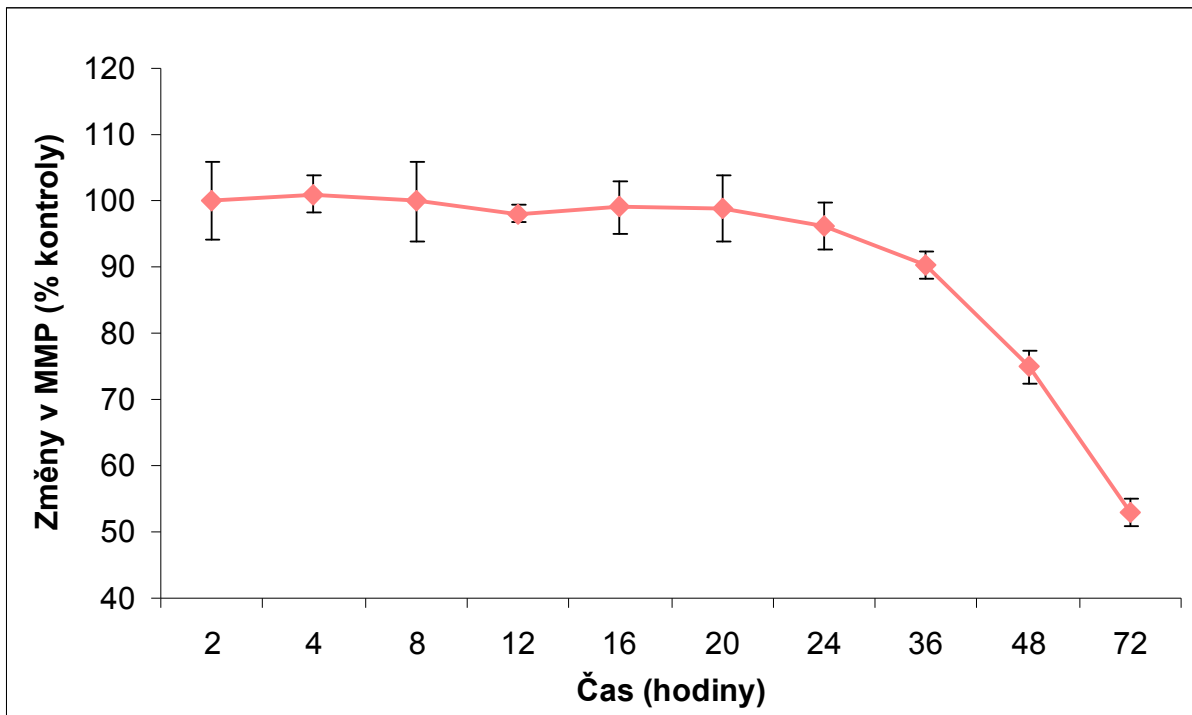


Obr. 5-8D Změny v obsahu ATP u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 10 µg/ml v intervalu 72h. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů.

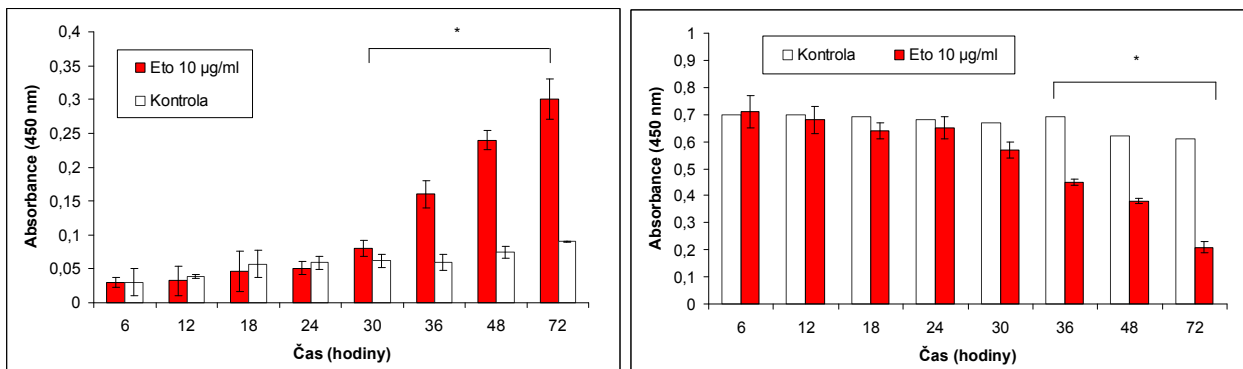
5.9. Etoposid indukuje na kaspázách závislou mitochondriální apoptózu

Mechanismy etoposidem indukované apoptózy v lidských melanomových buňkách linie Bowes byly studovány v souvislosti s mitochondriemi. Sledování změn v mitochondriálním membránovém potenciálu u ovlivněných buněk prokázalo, že k jeho významnému poklesu dochází až během pozdějších intervalů působení cytostatika – po 48-72h (Obr. 5-9A). Analýza fenoménu zvýšené propustnosti mitochondriální membrány (mitochondrial membrane transition) naopak naznačila poměrně časnou translokaci cytochromu c z mitochondriální matrix do cytoplazmy ovlivněných buněk (interval 30-36h od začátku ovlivnění – Obr. 5-9B a C).

Pro apoptózu klíčová aktivace exekučních enzymů kaspáz byla sledována pomocí kinetických testů. Kinetické testy prokázaly zvýšenou aktivitu obou enzymů v intervalu 24-36h od začátku ovlivnění etoposidem, přičemž maximum aktivity kaspázy-3 bylo poněkud posunuto v čase a bylo méně intenzivní. Při proměřování aktivit dalších zástupců rodiny kaspáz bylo dále zjištěno, že etoposid aktivuje i kaspázu-2 (Obr. 5-9D).

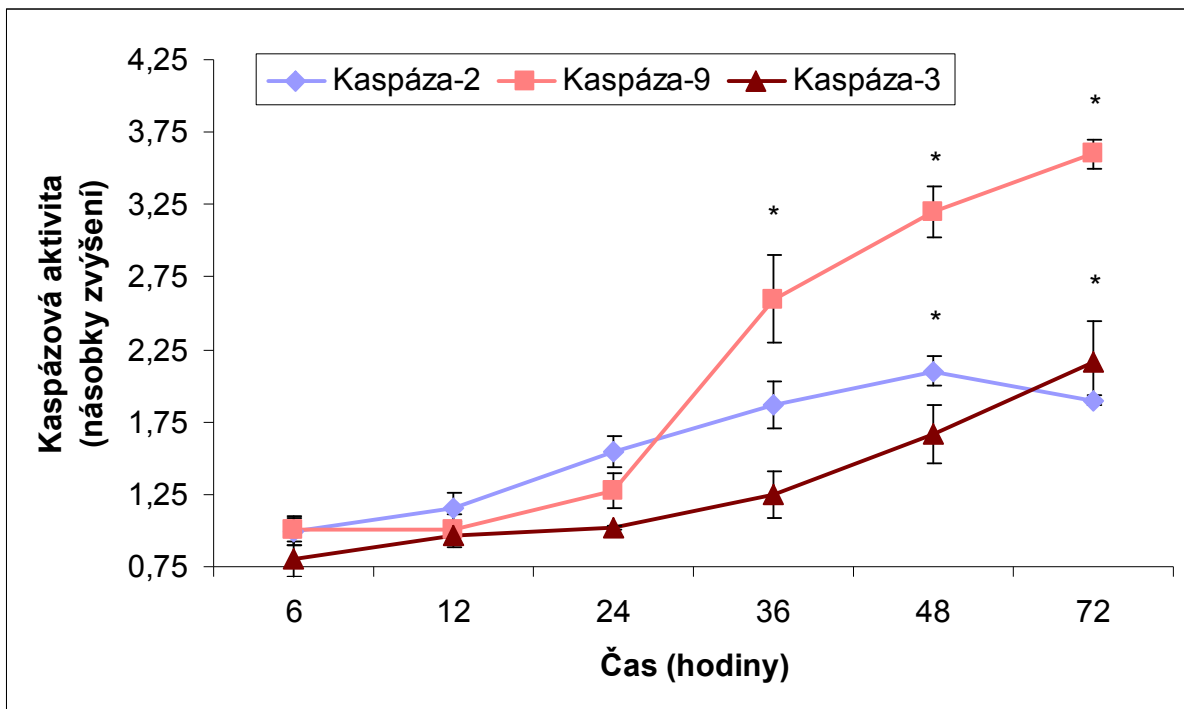


Obr. 5-9A Kinetika změn mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 72h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů.

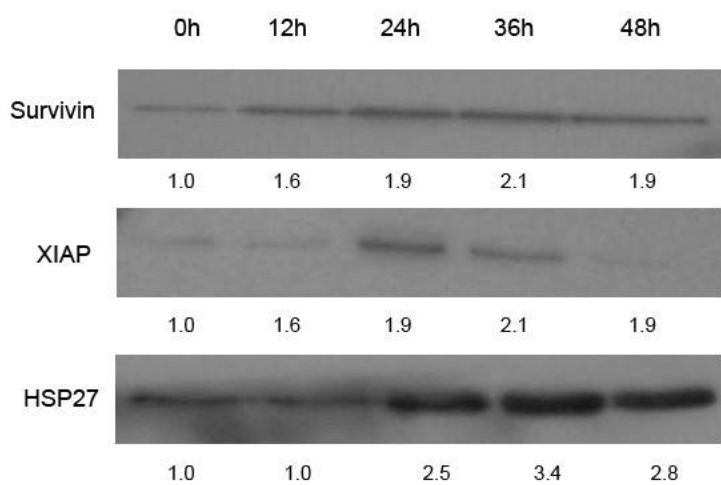


Obr. 5-9B a C Translokace cytochromu c do cytoplazmy (B) a úbytek koncentrace cytochromu c v mitochondriální frakci (C) u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 72h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními kulturami pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

Aktivace apoptózy nebyla doprovázena změnami v expresi inhibitoru apoptózy survivinu, avšak bylo detekováno přechodné zvýšení exprese proteinu XIAP (24-36h od začátku ovlivnění) a signifikantní zvýšení exprese proteinu tepelného šoku 27 (HSP27), které se projevilo již za 24h od začátku ovlivnění buněk etoposidem (Obr. 5-9E).



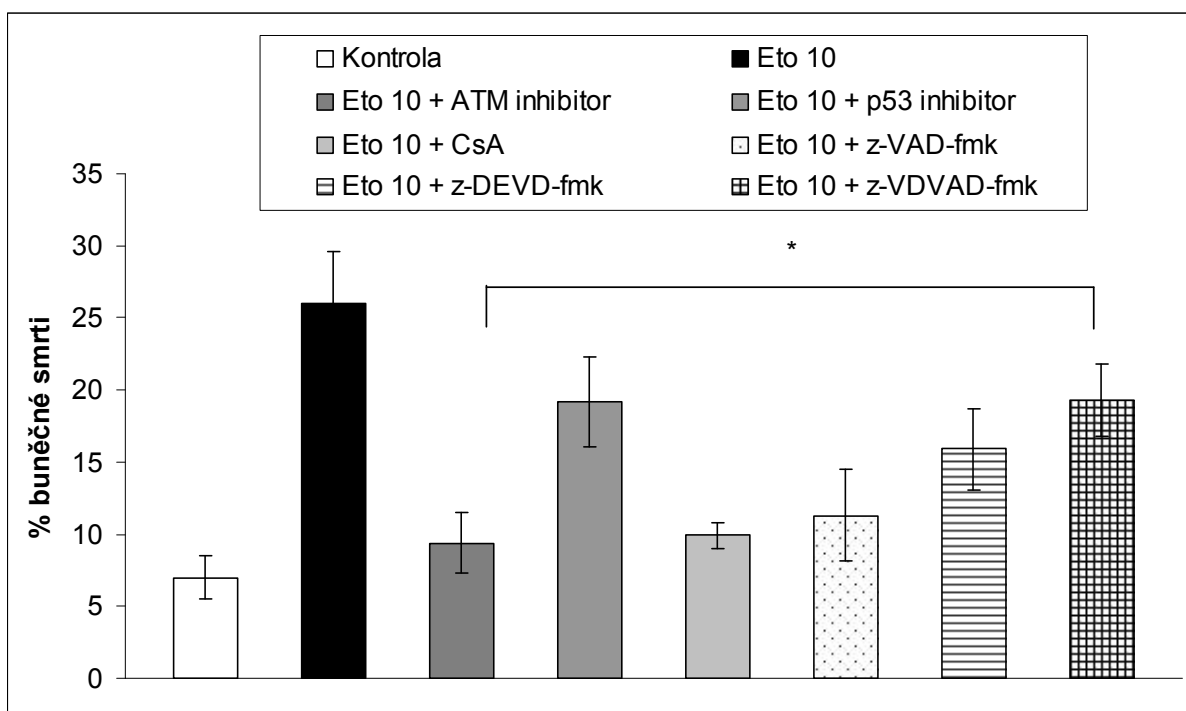
Obr. 5-9D Změny aktivity kaspázy-9, kaspázy-3 a kaspázy-2 u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 72h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s časovým intervalem ovlivnění 6h pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



Obr. 5-9E Western blottingová analýza exprese proteinů inhibujících apoptózu u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 48h. Nanášky proteinů byly normalizovány k β -aktinu a kvantifikace proužků byla provedena softwarem GelQuant Ver 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Izrael). Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů.

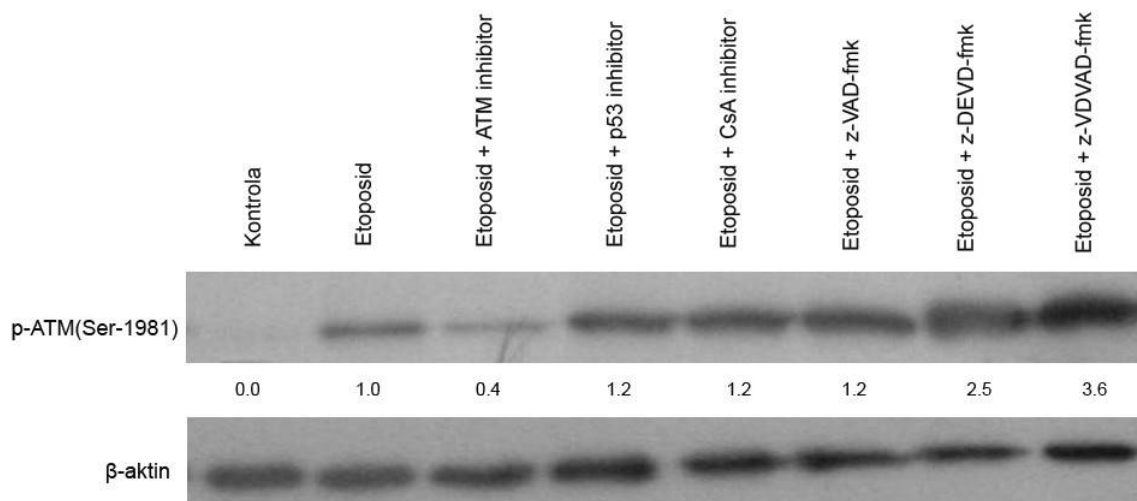
Izrael). Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů.

Inhibice jednotlivých kroků stresové a proapoptické signalizace vyvolané etoposidem pomocí specifických inhibitorů prokázala, že ATM kináza, protein p53, translokace cytochromu c a kaspázy hrají významnou úlohu při etoposidem navozené smrti



Obr. 5-9F Účinek inhibitorů na 1 µg/ml etoposidem (Eto) vyvolanou apoptózu u lidské melanomové linie Bowes v intervalu 72h. Dvanáct hodin či 1h před ovlivněním etoposidem byly k buňkám přidány inhibitory ATM kinázy, cytochromu c (cyklosporin A), p53 (Pifitrin- α), pankaspáz (z-VAD-fmk), kaspázy-2 (z-VDVAD-fmk) a kaspázy-3 (DEVD-fmk). Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s buňkami Bowes ovlivněnými etoposidem pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

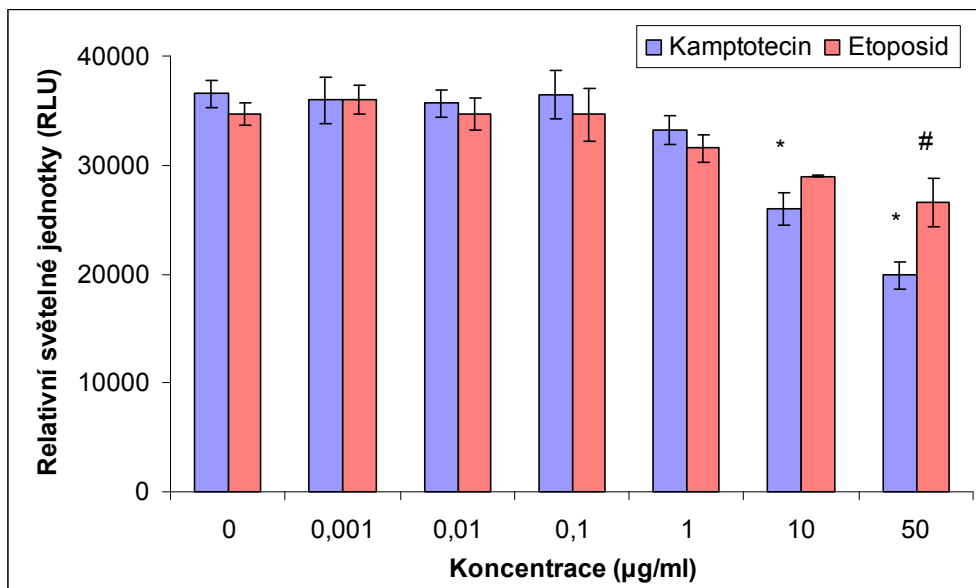
melanomových buněk linie Bowes. Účinnost jednotlivých inhibičních kroků se však individuálně lišila, přičemž úplně se apoptózu podařilo potlačit při inhibici ATM kinázy, při inhibici translokace cytochromu c a při inhibici aktivace všech kaspáz. Tyto výsledky odpovídají také přítomnosti fosforylované (aktivované) ATM kinázy u buněk Bowes předovlivněných výše zmíněnými inhibitory a podtrhují význam této molekuly při etoposidem indukované buněčné smrti (Obr. 5-9G).



Obr. 5-9G Western blottingová analýza exprese fosforylované (aktivované) formy ATM kinázy u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné etoposidem v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ a ovlivněné kombinací etoposidu a specifického inhibitoru v intervalu 72h. V daný časový interval před ovlivněním etoposidem (viz Materiál a metodiky) byly k buňkám přidány inhibitory ATM kinázy, cytochromu c (cyklosporin A - CsA), p53 (Pifitrin- α), pankaspáz (z-VAD-fmk), kaspázy-2 (z-VDVAD-fmk) a kaspázy-3 (DEVD-fmk). Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. Nanášky proteinů byly normalizovány k β -aktinu a kvantifikace proužků byla provedena softwarem GelQuant Ver 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Izrael). Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů.

5.10. Cytotoxicita a proapoptotická aktivita kamptotecinu, etoposidu a jejich kombinace na melanomových buňkách s odlišným statutem genu tp53

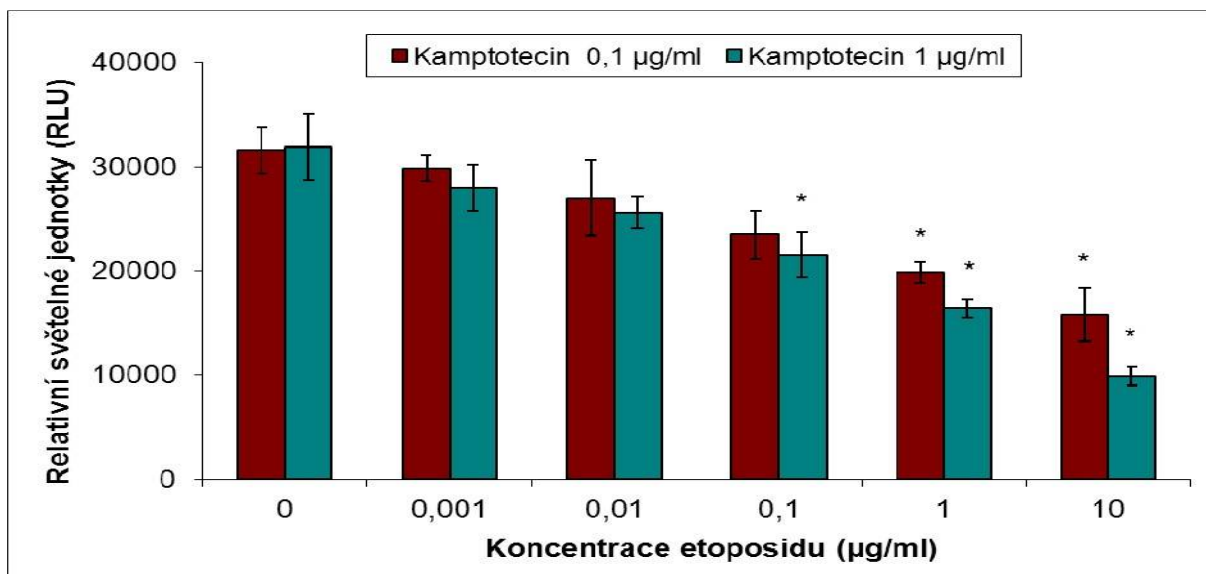
Cytotoxicita inhibitorů topoisomerázy I (kamptotecin) a topoisomerázy II (etoposid) byla prokázána na lidských melanomových liniích s divokým (nemutovaným) genem tp53 (např. Bowes - viz oddíly 5.1 a 5.5). Získané výsledky také potvrdily, že kamptotecin vykazoval vyšší antiproliferační a cytotoxickou aktivitu v porovnání s etoposidem. Protože podstatou cytotoxicity a proapoptotické aktivity obou cytostatik bylo poškození DNA, aktivace na p53 závislé signalizace a mitochondriální apoptóza, byly tyto mechanismy dále ověřovány na melanomové linii SK-Mel-28, která nese mutovaný gen tp53. Zároveň byl také porovnáván účinek kombinace obou cytostatik, a to jak u tp53 nemutované melanomové linie (Bowes) tak u linie nesoucí mutaci v genu tp53 (SK-Mel-28). Ukázalo se, že podobně jako u linie Bowes byl kamptotecin účinnější také u linie SK-Mel-28, i když tato linie byla obecně daleko rezistentnější k oběma cytostatikům než buňky linie Bowes (Obr. 5-10A).



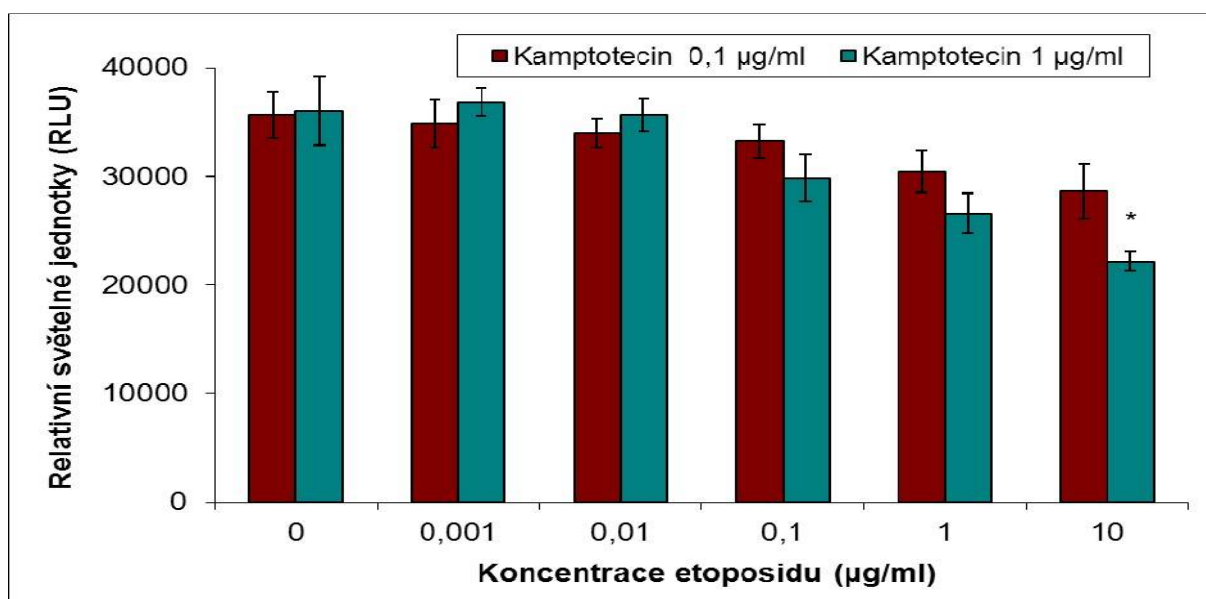
Obr. 5-10A Cytotoxicita kamptotecinu a etoposidu testovaná na lidské melanomové linii SK-Mel-28 v intervalu 24h pomocí inkorporace značeného BrdU. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolou # $P < 0,05$ v porovnání s kamptotecinem o stejné koncentraci a ve stejném časovém intervalu pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

Při použití kombinace obou cytostatik se jako nejúčinnější jevila kombinace kamptotecin (1 µg/ml) a etoposid (10 µg/ml), která inhibovala proliferaci obou melanomových linií nezávisle na stavu genu tp53 (Obr. 5-10B a C).

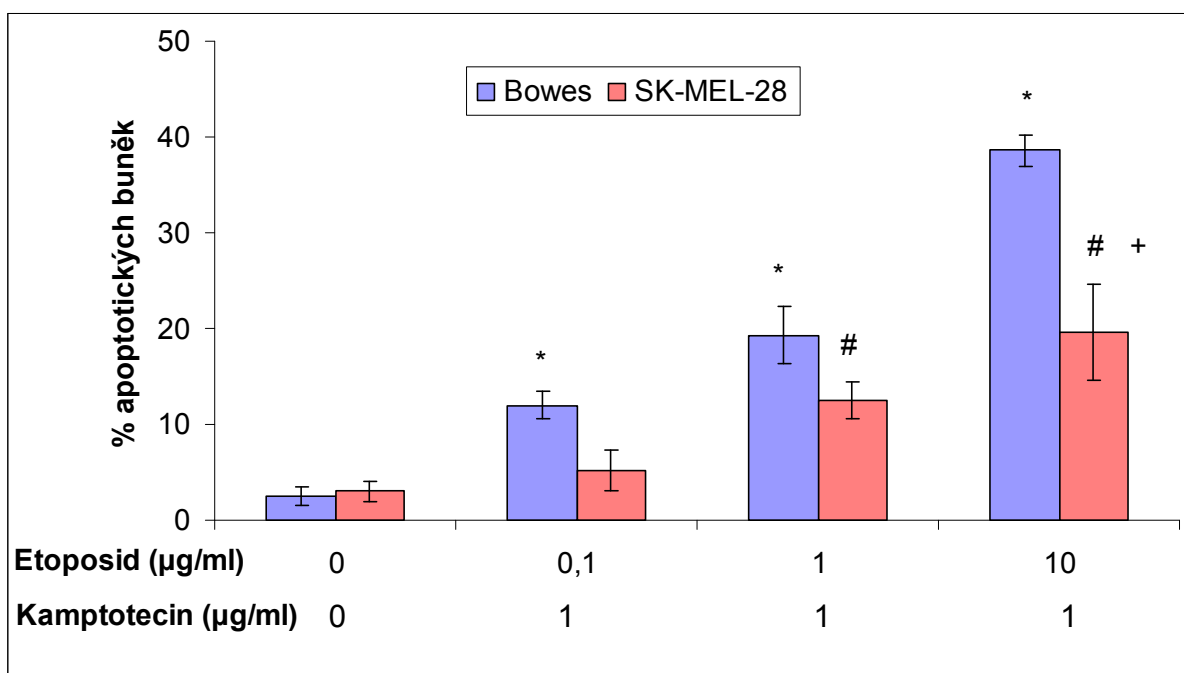
Z důvodů provázanosti pokusů a díky vztahu mezi cytotoxicitou a navozenou buněčnou smrtí byla pro vybrané kombinace kamptotecinu a etoposidu stanovena u obou testovaných buněčných linií míra apoptózy. Podle předpokladů kombinace s nejúčinnější cytotoxickou aktivitou vyvolávala i nejvyšší míru apoptózy, i když se také v tomto případě projevila rozdíly mezi buňkami s mutovaným a nemutovaným genem tp53 (buňky s mutovaným genem tp53 se jevily jako významně méně citlivé ke kombinaci obou cytostatik) (Obr. 5-10D).



Obr. 5-10B Cytotoxicita kombinací kamptotecinu a etoposidu testovaná na lidské melanomové linii Bowes v intervalu 24h pomocí inkorporace značeného BrdU. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolou pro danou koncentraci kamptotecinu pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



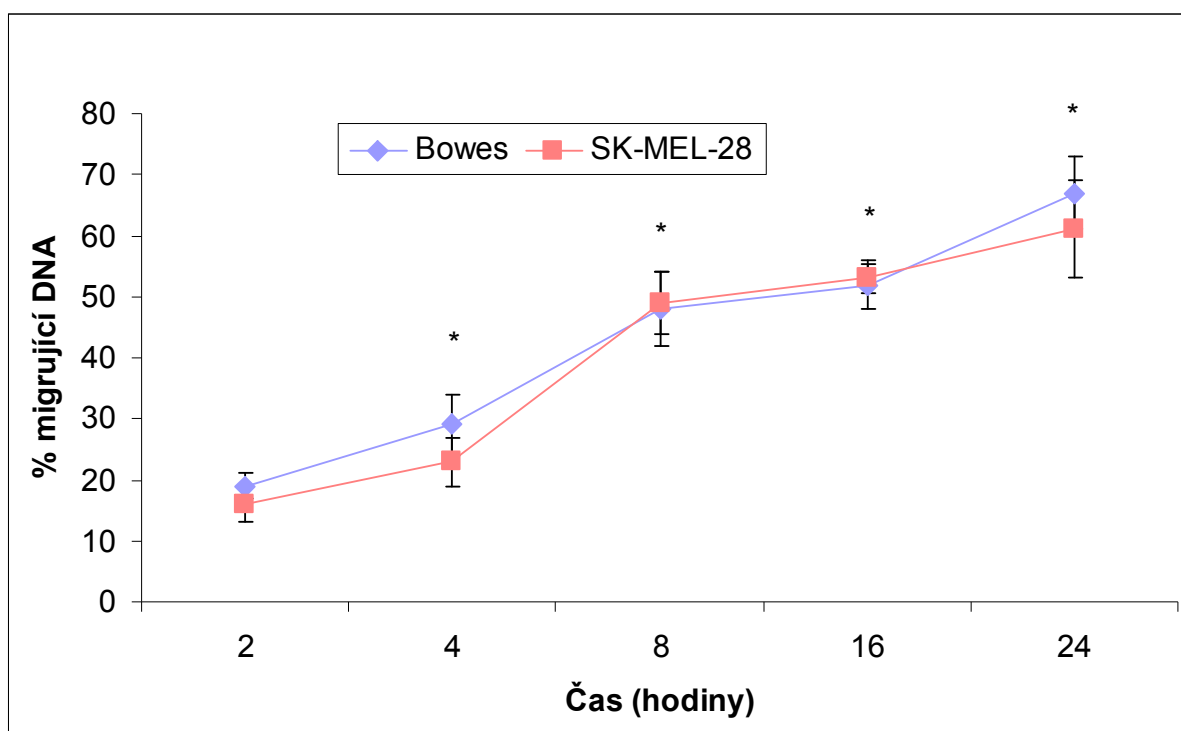
Obr. 5-10C Cytotoxicita kombinací kamptotecinu a etoposidu testovaná na lidské melanomové linii SK-Mel-28 v intervalu 24h pomocí inkorporace značeného BrdU. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolou pro danou koncentraci kamptotecinu pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



Obr. 5-10D Apoptóza indukovaná kombinacemi kamptotecinu a etoposidu u lidských melanomových linií Bowes a SK-MEL 28 v intervalu 24h pomocí měření obsahu buněk s hypodiploidní DNA. Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tři nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními buňkami Bowes # $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními buňkami SK-Mel-28 + $P < 0,05$ v porovnání s buňkami Bowes ovlivněnými stejnými koncentracemi kamptotecinu a etoposidu ve stejný časový interval pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

5.11. Poškození DNA a oxidativní stres indukovaný kombinací kamptotecinu a etoposidu na melanomových buňkách s odlišným statutem genu tp53

Pro objasnění mechanismů, kterými účinná kombinace obou cytostatik (kamptotecin 1 µg/ml a etoposid 10 µg/ml) navozuje cytotoxicitu a buněčnou smrt u melanomových buněk byla sledována integrita DNA a redoxní stav v ovlivněných buňkách. První významné změny ve struktuře DNA obou melanomových linií byly patrné již po 4h působení a s délkou působení testované kombinace cytostatik se tyto změny porovnatelně prohlubovaly, přičemž maxima dosáhly po 24h (Obr. 5-11A).

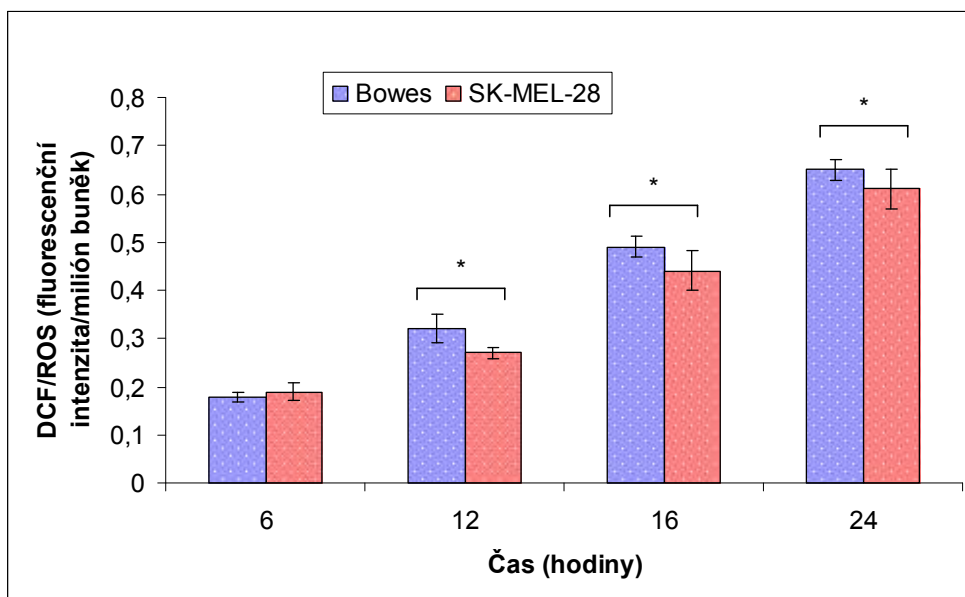


Obr. 5-11A Poškození DNA stanovované pomocí Comet assay u lidských melanomových linií Bowes a SK-Mel-28 ovlivněných kombinací kamptotecinu v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a etoposidu v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními liniemi, které měly vždy migrační intenzitu DNA nižší než 5 % pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

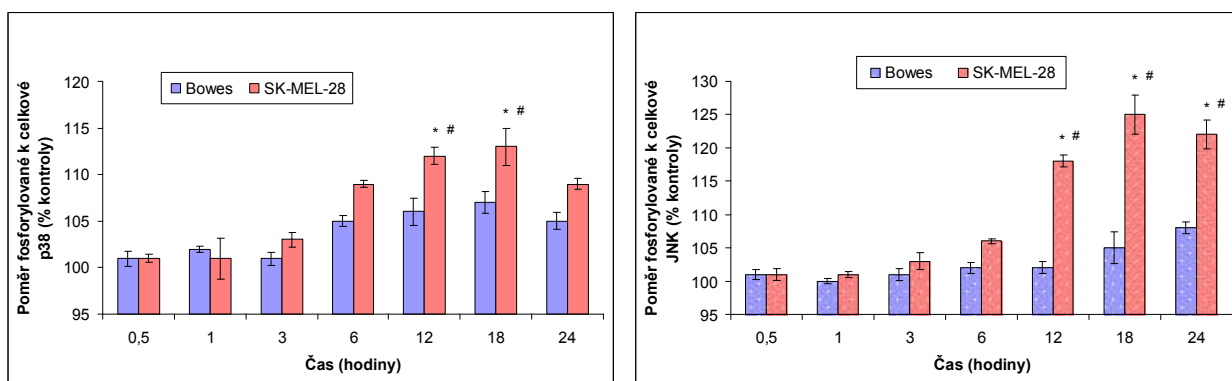
Sledování časových změn redoxního stavu ovlivněných buněk prokázalo, že oproti poškození DNA, cytostatiky navozená tvorba reaktivních forem kyslíku dosáhla významných hladin až za 12h od začátku jejich působení, ale v čase neustále stoupala, a to opět u obou modelových melanomových linií porovnatelně stejně (Obr. 5-11B).

5.12. Kombinace inhibitorů topoizomerázy stimuluje změny v aktivitě stresových kináz

S ohledem na známé mechanismy aktivace apoptózy, které zahrnují oxidativní stres a aktivní podíl tzv. stresových kináz, byla aktivita těchto enzymů měřena u obou modelových melanomových linií. Výsledky těchto pokusů ukázaly, že testovaná kombinace obou cytostatik vyvolala časově závislou aktivaci p38 a JNK u linie SK-MEL-28. Na druhé straně u linie Bowes byla zaznamenána pouze mírně zvýšená aktivita výše zmíněných kináz, a to v pozdějších časových intervalech (Obr. 5-12A a B).



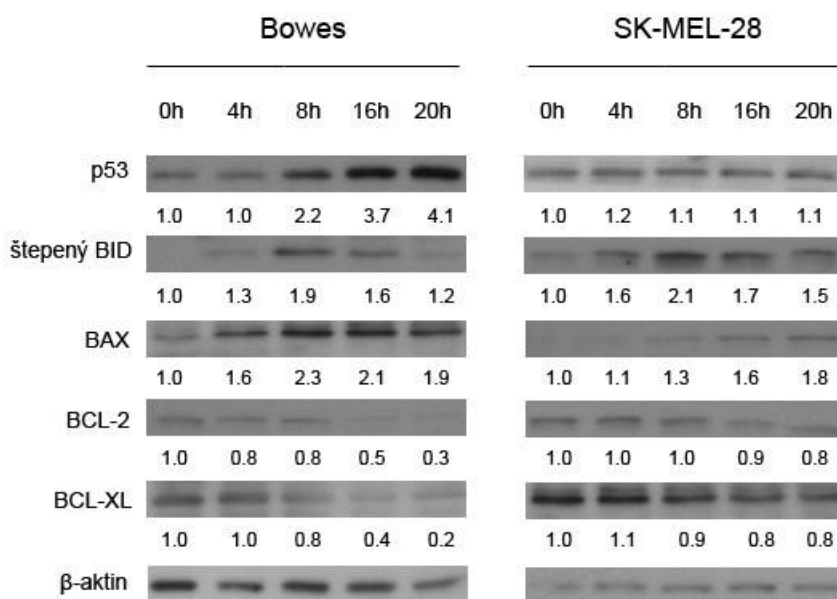
Obr. 5-11B Tvorba reaktivních forem kyslíku (oxidativní stres) u lidských melanomových linií Bowes a SK-Mel-28 ovlivněných kombinací kamptotecinu v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a etoposidu v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními liniemi, kde byla vždy hodnota fluorescence nižší než 0,1 pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



Obr. 5-12A a B Kinetika aktivace stresových kináz (A) p38 a (B) JNK u lidských melanomových linií Bowes a SK-Mel-28 ovlivněných kombinací kamptotecinu v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a etoposidu v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolní linií SK-Mel-28 # $P < 0,05$ v porovnání s linií Bowes ve stejný časový interval ovlivnění pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

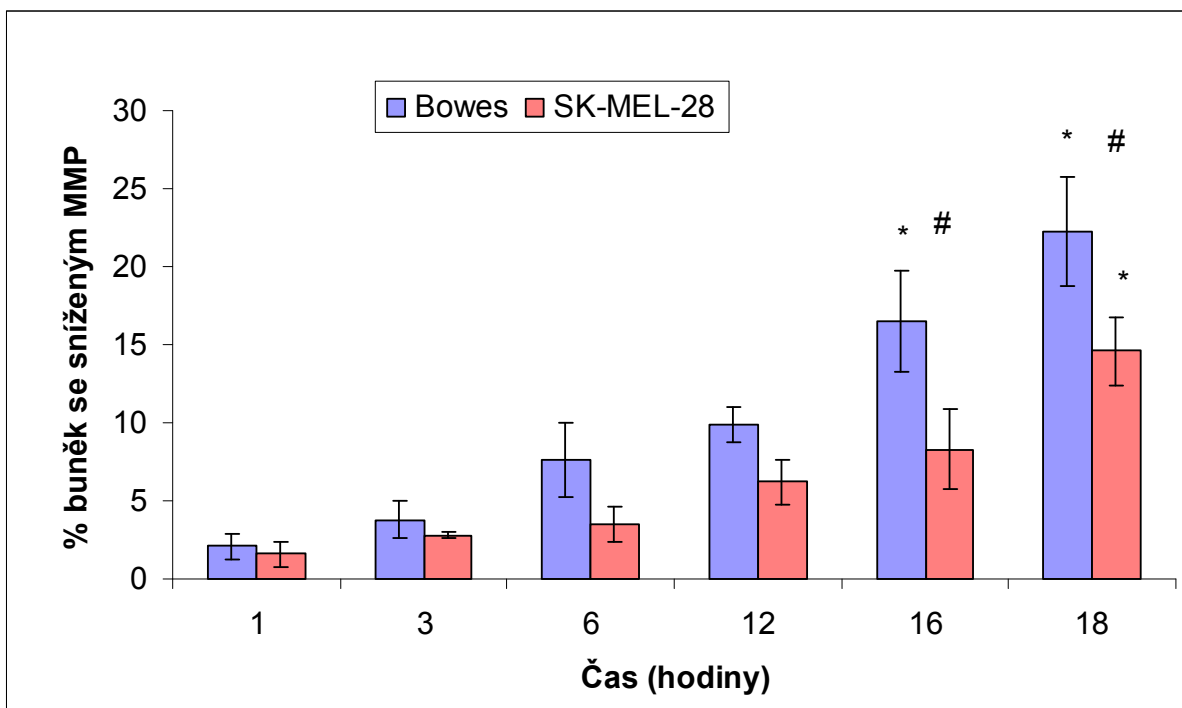
5.13. Kombinace inhibitorů topoizomerázy aktivuje mitochondriální a na kaspáze závislou apoptózu

Pro získání detailnější představy o zapojení specifických mediátorů apoptózy v modelu lidských melanomových linií ovlivněných kombinací inhibitorů topoizomeráz byly analyzovány expresní profily vybraných proapoptotických a antiapoptotických proteinů. Výsledky ukázaly, že u buněk linie Bowes se po použití kombinace cytostatik již po 8h zvyšovalo množství proteinu p53 a BAX. Ve zhruba stejném časovém horizontu došlo ke specifickému štěpení proteinu BID a ke snížení množství proteinů BCL-2 a BCL-XL. Tyto změny předcházely změnám v mitochondriálním membránovém potenciálu, který významně klesal v intervalu mezi 12-16h od začátku ovlivnění. Na druhé straně u buněk linie SK-Mel-28 nebyly zaznamenány žádné změny v expresi genu tp53 a ačkoliv se množství proteinu Bax postupně zvyšovalo a došlo i ke specifickému štěpení proteinu BID, množství proteinů BCL-2 a BCL-XL zůstávalo na konstantní úrovni (Obr. 5-13A a B).



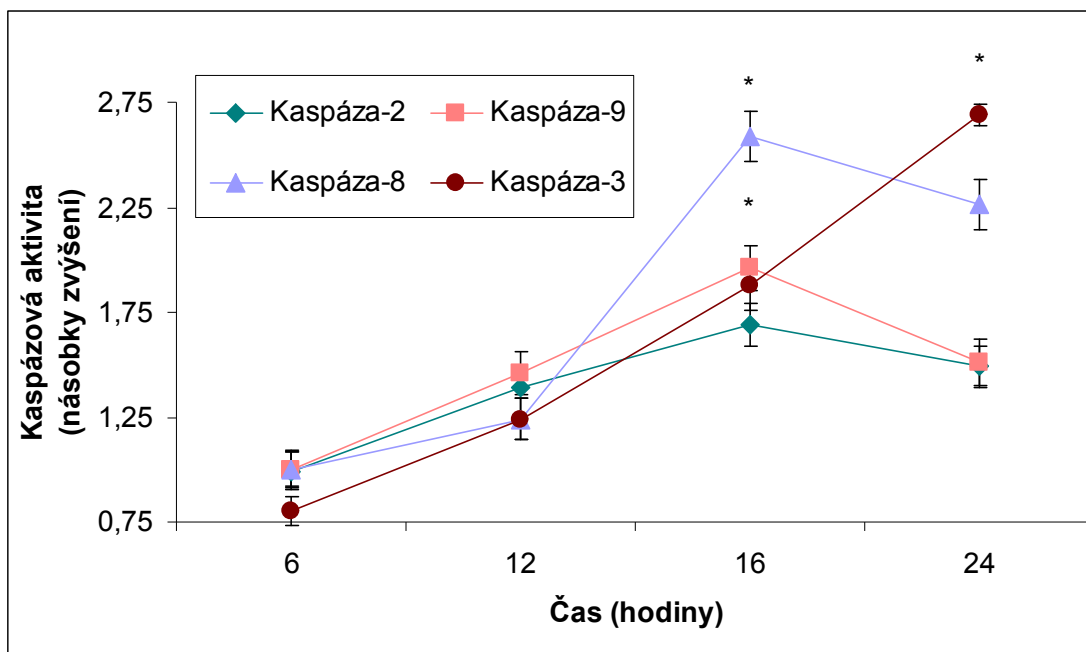
Obr. 5-13A Western blottingová analýza exprese proteinů regulujících apoptózu u lidských melanomových linií Bowes a SK-Mel-28 ovlivněných kombinací kamptotecinu v koncentraci 1 µg/ml a etoposidu v koncentraci 10 µg/ml v intervalu 24h. Nanášky proteinů byly normalizovány k β-aktinu a kvantifikace proužků byla provedena softwarem GelQuant Ver 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems,

Jerusalem, Izrael). Hodnoty představují průměry ± SD alespoň tří nezávislých pokusů.

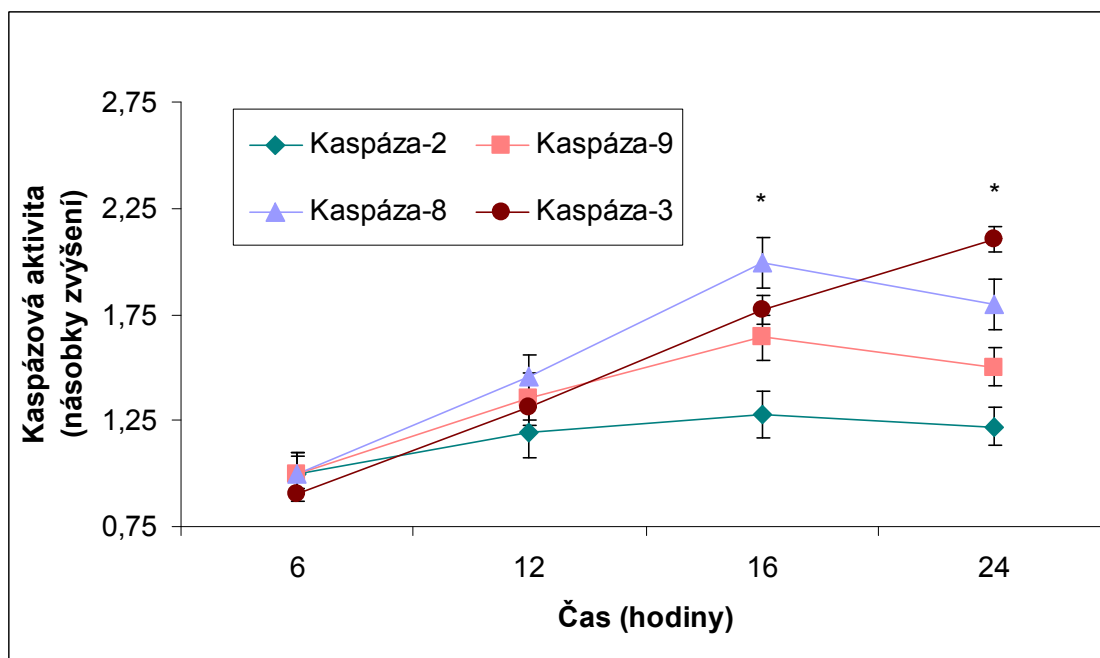


Obr. 5-13B Kinetika změn v mitochondriálním membránovém potenciálu (MMP) u lidských melanomových linií Bowes a SK-Mel-28 ovlivněných kombinací kamptotecinu v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a etoposidu v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními liniemi na počátku ovlivnění # $P < 0,05$ v porovnání s linií SK-Mel-28 ve stejný interval ovlivnění pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

Korelace pozorovaných změn v expresi apoptózu regulujících mediátorů a aktivity mitochondrií byla prováděna stanovením aktivity vybraných iniciačních (kaspáza-2, kaspáza-8 a kaspáza-9) a exekučních kaspáz (kaspáza-3). Kinetické analýzy naznačily, že s výjimkou kaspázy-2, jejíž funkce se u cytostatiky ovlivněných buněk linie SK-Mel-28 jevila jako minoritní, aktivita ostatních sledovaných kaspáz významně rostla, a to v intervalu 12-16h od začátku ovlivnění. Dalším závěrem těchto studií bylo také to, že aktivita kaspáz byla obecně nižší u buněk linie SK-Mel-28 (Obr. 5-13C a D).



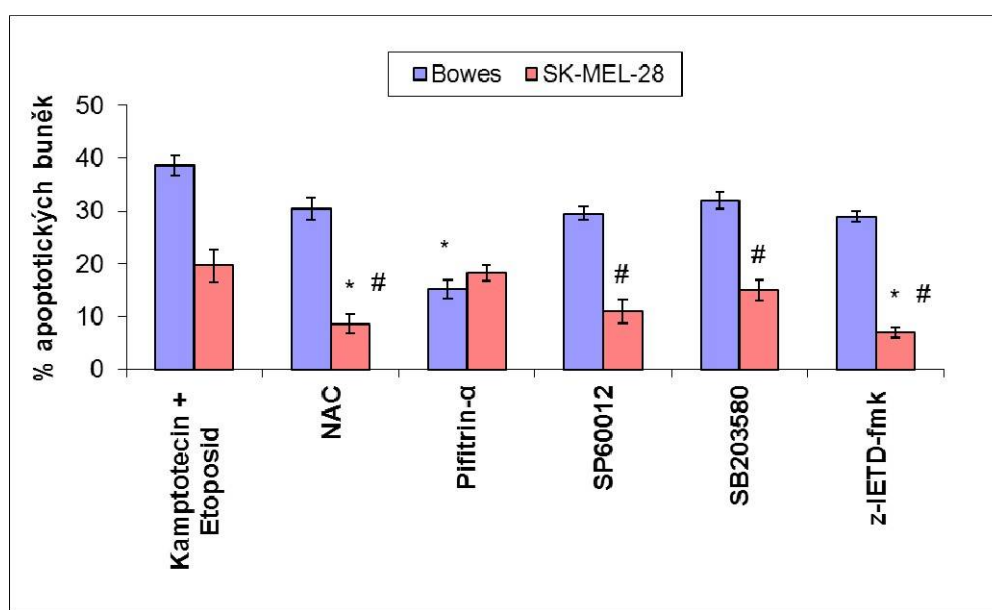
Obr. 5-13C Změny aktivity kaspázy-2, kaspázy-8, kaspázy-9 a kaspázy-3 u lidské melanomové linie Bowes ovlivněné kombinací kamptotecinu v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a etoposidu v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s časovým intervalem ovlivnění 6h pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.



Obr. 5-13D Změny aktivity kaspázy-2, kaspázy-8, kaspázy-9 a kaspázy-3 u lidské melanomové linie Sk-Mel-28 ovlivněné kombinací kamptotecinu v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a etoposidu v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v intervalu 24h. Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s časovým intervalem ovlivnění 6h pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

5.14. Kombinace inhibitorů topoizomerázy aktivuje pro buněčnou linii specifickou proapoptotickou signalizaci

Význam jednotlivých mediátorů a signálních drah při apoptóze lidských melanomových linií Bowes a SK-Mel-28 vyvolané kombinací inhibitorů topoizomeráz byl ověřen pomocí specifických inhibitorů. Významného snížení apoptózy u buněk linie Bowes bylo dosaženo



Obr. 5-14A Účinek inhibitorů na apoptózu indukovanou kombinací kamptotecinu v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a etoposidu v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ u lidských melanomových linií Bowes a SK-Mel 28 v intervalu 24h. V daný časový interval před ovlivněním kombinací cytostatik (viz Materiál a metodiky) byly k buňkám přidány antioxidant NAC, inhibitory p53 (Pifitrin- α), p38 (SB203580), JNK (SP60012) a kaspázy-8 (z-IETD-fmk). Hodnoty představují průměry \pm SD alespoň tří nezávislých pokusů. * $P < 0,05$ v porovnání s buňkami Bowes ovlivněnými etoposidem pomocí jednocestného testu Anova a Dunnettova mnohočetného porovnávacího testu.

pouze prostřednictvím specifického inhibitoru p53 Pifitrinu- α zatímco antioxidant NAC stejně tak jako specifické inhibitory p38, JNK a kaspázy-8 se ukázaly jako neúčinné. U buněk linie SK-Mel-28 však antioxidant NAC významně snížil cytostatiky vyvolanou apoptózu stejně tak jako výše zmíněné inhibitory stresových kináz a kaspázy-8 (Obr. 5-14A).

6. DISKUSE

Lidský maligní melanom představuje v současné době významný medicínský problém. Přes výrazné pokroky v oblasti poznání biologie tohoto nádorového onemocnění, zpřesňující se definice rizikových faktorů jeho vzniku i dostupnosti moderních diagnostických a léčebných postupů, incidence melanomu stoupá a s ní stoupá i individuální celoživotní riziko jeho vzniku. Pokročilá stádia melanomu, a to zejména diseminující nebo metastatické formy, jsou v současné době prakticky neléčitelné klasickými chirurgickými postupy, případně radioterapií, a proto pokračuje intenzivní výzkum v oblasti chemoterapie. Efektivní systémová chemoterapie pokročilých stádií melanomu neexistuje, přičemž mnohé léčebné protokoly založené na použití jednotlivých cytostatik nebo jejich kombinace selhaly (80, 91). Jedním z důvodů zvýšené rezistence melanomových buněk *in vitro* a *in vivo* vůči jednotlivým cytostatikům či jejich kombinacím je akumulace genetických aberací, jakými jsou např. chromozomální delecce či amplifikace, které následně vedou ke změnám na úrovni biochemických signalizačních drah s následnými alteracemi v biologickém chování. Některé mechanismy a faktory, které podmiňují vznik a rozvoj chemorezistence jsou známy a zahrnují např. zvýšenou aktivitu DNA reparačních procesů zajišťující stabilitu nádorových buněk vůči poškození DNA (87), zvýšenou expresi tzv. multidrug resistance proteins (MDRP) nebo zvýšenou odolnost proti navozené buněčné smrti (28). Mnoho ostatních však zůstává nejasných.

Kromě výzkumu primárně zaměřeného na vývoj účinné cytostatické léčby melanomu pokračují také intenzivní studia zaměřená na identifikaci a validaci prognostických markerů pokročilých stádií tohoto maligního onemocnění. Mezi potenciální kandidáty patří exprese topoisomeráz, tedy enzymů, které se podílejí na replikaci, rekombinaci a reparaci genetické informace, ale také regulují transkripci a odpověď na různá cytostatika (33, 66). Amplifikace genu pro topoisomerázu I a její následná zvýšená exprese byla nalezena v různých typech nádorů včetně maligního melanomu, kde je spojena s horší prognózou (86). Zvýšená exprese topoisomerázy II α je také u nádorů poměrně častá a zahrnuje rovněž pokročilá stádia melanomu (63). Oba enzymy jsou v případě maligního melanomu obzvláště atraktivními cíly specializovaného výzkumu, protože mohou sehrát dvojí úlohu; jednak jako diagnostické markery stádia nádorového onemocnění a také jako cíl protinádorové léčby.

Inhibice topoisomeráz I a II α je obecně účinná při léčbě mnoha vysoce agresivních a invazivních nádorů jakými jsou např. lymfomy, nádory prsu či malobuněčný karcinom plic

(2, 7, 23, 34). Z důvodů vysoké exprese obou enzymů v buňkách maligního melanomu by tedy mohlo využití specifických inhibitorů topoisomeráz také v tomto případě znamenat významný léčebný přínos. Naneštěstí se však ukázalo, že dostupné inhibitory topoisomeráz jsou jak v monoterapii tak v kombinovaných protokolech neúčinné (56). I když tedy v současné době tyto látky nejsou indikovány k systémové chemoterapii pokročilých stádií melanomu, jejich mechanismy působení na melanomové buňky a typy vyvolaných biologických odpovědí jsou neustále zkoumány.

Tato práce si vytkla za cíl bližší pochopení podstaty buněčné odpovědi vybraných lidských melanomových linií na kamptotecin (inhibitor topoisomerázy I) a etoposid (inhibitor topoisomerázy II α) včetně jejich kombinací v modelu *in vitro*. Zvláštní pozornost byla věnována analýze tzv. stresových signálních drah vedoucích k navození buněčné smrti – apoptózy.

Protože účinnost inhibitorů topoisomeráz je primárně závislá na přítomnosti cílové molekuly v buňce, v první řadě jsme ověřovali expresi obou enzymů pomocí Western blotingu. Zjistili jsme, že všechny čtyři melanomové linie exprimují oba enzymy, ale úroveň exprese se mezi jednotlivými liniemi významně liší. Potenciálně nejvyšší množství topoisomerázy I jsme našli u linie Bowes, která je vysoce agresivní a metastatická, což odpovídá publikovaným zkušenostem s primárními a metastatickými melanomy (86). Ještě vyšší variabilitu jsme našli u expresního profilu topoisomerázy II α . Tento enzym není u melanomů univerzálně exprimován, i když jeho zvyšující se exprese koreluje s jejich histopatologickou a klinickou progresí (70). V našem případě jsme vyšší expresi tohoto enzymu našli v liniích Bowes a A2058, které jsou klasifikovány jako agresivní a metastatické, zatímco u linií WM-115 a SK-Mel-28 byla exprese signifikantně nižší, což by také odpovídalo jejich relativně nižšímu stupni malignity.

Po ověření přítomnosti topoisomeráz v našich modelových liniích jsme přistoupili ke studiím účinků kamptotecinu na tři liniích (Bowes, WM-115 a A2058), které nesou divokou (nemutovanou) formu genu p53. Bylo totiž prokázáno, že status genu p53 a na něm závislá signalizace významně ovlivňuje vnímavost maligních melanocytů k cytostatikům interagujícím s DNA, a to prostřednictvím několika mechanismů. Mutace v genu tp53 jsou sice u melanomu relativně vzácné (odhaduje se, že se vyskytují v cca 10-25% případech), nicméně mutovaná forma proteinu p53 není schopná transkripčně inhibovat expresi antiapoptotického proteinu BCL-2 a chemorezistenci podmiňujícího P-glykoproteinu (Pgp), a tak zvyšovat rezistenci melanomových buněk k buněčné smrti navozené poškozením DNA (59). Defektní aktivace genu tp53 (nižší transkripční aktivita) dále může přispívat ke slabé

odpovědi na DNA poškození ve smyslu apoptózy **(5)**. A konečně funkční interakce mezi na p53-závislými molekulami a ostatními mediátory proapoptotických signálních drah je často u melanomových buněk nefunkční, což je např. případ asociace proteinu p53 a proteinu 14-3-3, která přispívá ke snížené tendenci buněk aktivovat apoptózu **(88)**.

Výsledky studií zaměřených na antiproliferační účinky kamptotecinu u výše zmíněných linií prokázaly na koncentraci závislou cytotoxicitu této látky, která byla spojena také s indukcí mitochondriální apoptózy charakterizované změnami v mitochondriálním membránovém potenciálu, aktivací kaspáz-9 a -3 a specifickým štěpením PARPu. Mezi testovanými liniemi však existovaly rozdíly v úrovni navozené buněčné smrti, kdy se jako nejméně citlivá ukázala být linie WM-115. Následné analýzy prokázaly, že kamptotecin u této linie nevyvolal změny v expresi genu tp53 a ani protein p53 nebyl specificky fosforylován jako u linií Bowes a A2058. Podobný trend jsme zaznamenali i u proteinu p73, který patří do rodiny p53. Oba tyto proteiny jsou následně po poškození DNA stabilizovány a aktivovány **(47)** v závislosti na aktivitě check point kinázy 1 (Chk1) **(105)**. Protože však námi zjištěná aktivita Chk1 i úroveň poškození DNA byly přibližně stejné u všech studovaných linií, neschopnost indukce p53 a p73 u buněk WM-115 musí záviset na dalších komplexnějších mechanismech jako např. na diferenciální expresi specifických proteinových kináz, genomickém imprintingu nebo poruchách v signalizaci c-Abl **(47, 113)**

Cytostatiky navozené poškození DNA a následná apoptóza u nádorových buněk často zahrnují také další, na p53 nezávislý faktor – kaspázu-2 **(83)**. Kaspáza-2 byla nedávno prokázána jako klíčový prvek při docetaxelem navozené apoptóze melanomových buněk **(65)**. Někteří autoři se domnívají, že kaspáza-2 se asociuje s p53 indukovaným proteinem obsahujícím smrtící doménu a adaptorový protein (RAIDD) a v některých nádorech by jejím aktivátorem mohl být protein p73 **(116)**. Námi zjištěná diferenciální aktivace kaspázy-2 u modelových melanomových linií s tímto navrženým mechanismem koresponduje, protože kaspázová aktivita korelovala s expresními hladinami jak p53 tak p73.

DNA poškození vyvolává aktivaci a akumulaci proteinů p53 a p73, které následně aktivují cílové proapoptotické geny jako Bax, Noxa a Puma, jejichž produkty se translokují do mitochondrií. Také proteiny p53 a/nebo kaspáza-2 se mohou cíleně vázat na vnější mitochondriální membránu a tvořit komplexy s proteiny BCL-2 nebo BCL-XL, a tímto způsobem indukovat ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu a zvyšovat propustnost vnější mitochondriální membrány pro apoptogenní faktory **(64, 79, 116)**. Výsledky našich kinetických studií jsou v souladu s těmito závěry a ukazují zajímavé expresní profily jednotlivých proteinů. Zvláštní pozornost zasluhuje variabilita exprese

proteinu Noxa, protože jeho indukovaná exprese dokáže navodit buněčnou smrt i u melanomových linií s mutovaným genem tp53 a zvýšenou expresí proteinů BCL-2, BCL-XL a MCL-1 (**108**). V literatuře existují zprávy o funkčním spojení proteinů Noxa a p53, ale to nevysvětluje případ buněk linie WM-115, kde jsme zjistili zvýšené exprese proteinů Noxa i PUMA a přitom nezměněné hladiny proteinů p53 a p73. Mohlo by se tedy jednat o indukci exprese proteinu Noxa nezávisle na p53 a PUMA (**79**), což by v souvislosti s melanomy zasluhovalo další studie.

Kamptotecinem vyvolaná translokace do mitochondrií melanomových buněk byla v našem případě prokázána u proteinů p53, BAX, PUMA a Noxa, ovšem s významnými rozdíly u jednotlivých linií. Tyto výsledky pravděpodobně znamenají, že kamptotecin stimuluje signalizaci při které jsou v mitochondriích k dispozici různé proapoptotické proteiny, které následně zahajují exekuční fázi apoptózy. Tato zdánlivá redundance může mít několik vysvětlení. Zaprvé, může se jednat o přirozený mechanismus, který zajišťuje exekuci buněčné smrti ve chvíli, kdy je překročena kritická mez koncentrace určitých mediátorů apoptózy, a to i v případě, že některé z nich ani nemusí fungovat. Zadruhé, tento stav může odrážet variabilitu odpovědi maligních melanomových buněk reflektující jejich aberantní stav. Zatřetí, kamptotecin stejně jako jiná cytostatika (např. etoposid – viz níže) indukuje v nádorových buňkách mnohočetnou odpověď díky svému zacílení na různé kompartmenty a molekuly; kromě hlavního účinku poškozujícího DNA může působit i dalšími alternativními mechanismy.

Pro ověření významu kamptotecinem indukovaných mediátorů apoptózy jsme v konečném kroku této části práce tyto mediátory specificky zablokovali a sledovali dopady této inhibice na parametr mitochondriálního membránového potenciálu. Výsledky těchto pokusů prokázaly klíčovou úlohu proteinu BAX a p53 při kamptotecinem navozené buněčné smrti, ale pouze omezený význam kaspázy-2 (**15**). Na tomto místě se opět prokázalo, že ačkoliv jsou jednotlivé melanomové linie fenotypově v mnoha ohledech podobné (status tp53, exprese BAX atd.), existují mezi nimi velmi specifické a jemné rozdíly v expresních profilech jednotlivých stres, a zejména apoptózu regulujících proteinů, které jsou odpovědné za variabilitu jejich odpovědi na DNA poškozující cytostatika a tím i za jejich chemorezistenci či chemosensitivitu.

Vzhledem k výše diskutovanému komplexnímu účinku kamptotecinu na melanomových liniích *in vitro* a s ohledem na fakt, že další testovaný inhibitor topoisomerázy etoposid vykazuje podobně komplexní účinky na maligních buňkách (**68**) byla pro účely jeho testování vybrána linie Bowes. Cytotoxicita a proapoptotická aktivita etoposidu na buňkách

linie Bowes vykazovala dávkovou a časovou závislost a v porovnání s kamptotecinem byla spíše nižší. Mechanismus účinku etoposidu je podobný jako v případě kamptotecinu. Etoposid inhibuje u exponovaných buněk topoisomerázu II α , vyvolává vznik oboustranných zlomů v molekule DNA a aktivuje specifický kontrolní bod pomocí ATM kinázy (76). Výsledky našich experimentů tento fakt potvrzují a dále rozvíjejí v tom smyslu, že ATM kináza zprostředkuje zvýšení exprese proteinu p53 s jeho následnou specifickou fosforylací jako odpověď na působení etoposidu. V návaznosti na protein p53 jsme u etoposidem ovlivňovaných buněk linie Bowes pozorovali následné masivní zvýšení exprese proteinu BAX a pokles hladin antiapoptotického proteinu BCL-2, což odpovídá známému obecnému mechanismu iniciační apoptotické signalizace (50).

Mitochondrie představují významný buněčný kompartment, který hraje klíčovou úlohu při iniciaci a exekuci apoptózy, a to i u etoposidem navozené buněčné smrti nádorových buněk (52). Nedávné studie naznačují, že etoposidem navozená aktivace proteinu ATM může vést k mitochondriální biogenezi a snad přispívá také k lepší kontrole tvorby reaktivních forem kyslíku (24). Kromě toho může etoposid působit na mitochondrie i přímo a vyvolávat pokles buněčných zásob ATP (101). Ve světle těchto údajů jsme se následně zaměřili na vztah etoposid-mitochondrie. Zjistili jsme, že u mitochondrií melanomových buněk linie Bowes etoposid indukuje bifázickou odpověď. Nejdříve zvyšuje hustotu a aktivitu mitochondrií s korespondujícím nárůstem buněčných zásob ATP, aby následně došlo ke ztrátě hustoty mitochondriální sítě, poklesu jejich dynamiky, ale v přítomnosti relativně stabilních zásob ATP. Tyto výsledky nám při absenci dalších specifických testů neumožňují spolehlivě vysvětlit podstatu tohoto jevu, a to zejména zda k prvotnímu nárůstu hladin ATP došlo vlivem stoupajícího množství mitochondrií nebo jejich zvýšené aktivitě. Jestliže však vezmeme v úvahu také korespondující nárůst produkce superoxidového aniontu (jehož primárním producentem v buňkách jsou především mitochondrie), zdá se pravděpodobné, že etoposid v první fázi svého působení stimuloval nárůst počtu a hustoty mitochondrií. Zde však musíme poznamenat, že se může jednat o specifický účinek etoposidu pouze na buňkách linie Bowes, a tak zevšeobecnění těchto závěrů není bez verifikačních experimentů na jiných liniích melanomu možné.

Ztráta mitochondriálního potenciálu předchází exekční fázi apoptózy, přičemž z hlediska časování byla tradičně považována za časný projev celého procesu. V dnešní době je známo, že v mnohých modelech je tomu naopak (62). Tomu odpovídají také naše pozorování a dokonce v případě určitých buněčných typů může mitochondriální apoptóza proběhnout rovněž beze změn tohoto potenciálu (22, 37, 51).

Etoposidem navozená apoptóza melanomových buněk linie Bowes zahrnovala také aktivaci kaspázy-2. Kromě svého vlivu na specifické mitochondriální změny (viz kamptotecin) někteří autoři naznačili, že mechanismus jejího účinku nezávisí na oligomerizaci proteinu APAF-1 (81). To je v případě maligního melanomu důležité, protože je známo, že jedním z důvodů rezistence melanomových buněk k chemicky navozené apoptóze je ztráta exprese APAF-1 z důvodů časté mutace příslušného genu v tomto typu nádorového onemocnění (97). To by totiž vysvětlovalo aktivaci a exekuci apoptózy v buňkách linie Bowes i v nepřítomnosti významné exprese APAF-1. Kaspáza-2 však také podle našich výsledků může ovlivňovat aktivitu kaspázy-9, a to v časovém horizontu, který nekoresponduje s maximem vyplavení cytochromu c z mitochondrií buněk. Vzhledem k výše zmíněným kaspázám byla aktivita hlavní exekuční kaspázy – kaspázy-3 u etoposidem ovlivňovaných buněk Bowes relativně nízká a zpožděná. Jedním z důvodů mohla být zvýšená exprese survivinu, který je členem rodiny inhibitorů apoptózy (IAP) a jehož interakce s kaspázou-3 a následná inhibice byla u maligního melanomu již pozorována. Známé jsou také další inhibitory apoptózy jako např. XIAP či HSP-27, jejichž vysoké hladiny jsou obecně v liniích maligního melanomu přítomny (35). Oproti všem předpokladům se expresní profil survivinu u maligních buněk linie Bowes vystavených etoposidu neměnil. Na druhé straně se přechodně zvýšila koncentrace proteinu XIAP, což by vysvětlovalo pomalejší a méně intenzivní aktivaci kaspázy-3. Na druhé straně však došlo k velmi významnému nárůstu množství HSP-27, který jak bylo literárně popsáno inhiboval aktivitu kaspázy-9 u lidských leukemických buněk linie U937 exponovaných etoposidu (27). V našem modelu však po působení etoposidu aktivita kaspázy-9 konstantně vzrůstala, a tak nejpříjemnějším vysvětlením zůstává předpoklad, že se buňky Bowes tímto způsobem pokusily (byť neúspěšně) bránit proti navozenému stresu a hrozbě exekuce buněčné smrti.

Podobně jako v případě kamptotecinu jsme v maligních melanomových buňkách potvrdili etoposidem navozenou aktivaci několika paralelních signálních drah vedoucích k apoptóze. Následná specifická inhibice jednotlivých mediátorů a kroků v těchto signálních drahách jednoznačně označila ATM kinázu jako nejvýznamnější prvek pro apoptózu klíčové signalizace. Na druhé straně úloha kaspázy-2 se také v tomto modelu ukázala být jako sekundární, i když celková role kaspáz má patrně ve světle našich výsledků daleko širší dosah.

I když inhibitory topoisomeráz nepatří mezi indikovaná cytostatika pro léčbu pokročilých stádií maligního melanomu, některé z nich dokázaly inhibovat proliferaci maligních melanocytů (16, 75) ačkoliv na ně ve stejných buněčných populacích může vznikat

rezistence **(53)**. Protože maligní melanomové buňky akumulují mutace, kombinují mechanismy rezistence a vykazují variabilní expresivitu topoisomeráz **(56)** spolu s defektní na p53 závislé dráhy **(31)**, potenciálně výhodná chemoterapeutická strategie může kombinovat inhibici obou topoisomeráz za současného zvýšení cytotoxicity prostřednictvím rozšířeného spektra ovlivněných buněčných cílů.

V závěrečné části naší práce jsme se proto věnovali studiu mechanismů cytotoxických účinků kombinace inhibitorů topoisomerázy I a II α , a to na dvou melanomových liniích lišících se statutem genu tp53 (nemutovaný – Bowes a mutovaný – SK-Mel-28). Nejdříve jsme prokázali nižší úroveň cytotoxicity obou inhibitorů (samotných nebo v kombinaci) u melanomových buněk s mutovaným genem tp53 což odpovídá již publikovaným zkušenostem dalších výzkumných skupin **(60)**. Na druhé straně kombinace obou inhibitorů vykazovala výrazně potencionovaný cytotoxický účinek, a to i u linie SK-Mel-28 s mutovaným genem tp53. Stejná kombinace cytostatik navozovala i apoptózu, která však byla u výše zmíněné linie výrazně omezenější.

Po působení kombinace kamptotecinu a etoposidu došlo k výraznému časově závislému nárůstu poškození DNA a ke zvýšení tvorby reaktivních forem kyslíku – oxidativnímu stresu. Oxidativní stres má v buňce mnoho specifických i nespecifických cílů a jedním z nich jsou stresové kinázy p38 a JNK **(72, 106)**. Na základě cílených ELISA testů jsme prokázali diferenciální expresi těchto enzymů u exponovaných buněk. Zatímco u buněk linie Bowes jsme nezaznamenali výrazný nárůst aktivity těchto kináz, u buněk SK-Mel-28 k jejich aktivaci došlo v časovém horizontu mezi 12 a 24h expozice. Tyto výsledky jsou překvapivé a naznačují relativně neprozkoumanou oblast biologie melanomu, kdy se jednotlivé populace melanomových buněk liší ve své toleranci ke zvýšeným hladinám oxidativního stresu **(111)**. Celý vztah mezi genem tp53 (funguje jako sensor oxidativního poškození a aktivátor apoptózy) a stresovými kinázami u ovlivňovaných melanomových buněk je však ve skutečnosti o mnoho komplikovanější, protože se objevily zprávy o oxidativnímu stresem aktivované p38/JNK dráze vázané pouze na buňky jak s nemutovaným genem tp53 **(89)** tak mutovaným **(32)**.

Protein p53 a na něm závislá signální dráha zjevně hraje také v melanomu významnou úlohu, i když jako takový je tento gen-protein mutován relativně zřídka. Častější je jeho aberantní aktivace **(88)**, což je patrné i našich výsledků, které ukazují jasné rozdíly v expresi na p53 závislých proteinů BAX, BCL-2, BCL-XL a BID u obou studovaných melanomových linií exponovaných inhibitorům topoisomeráz. Na tomto místě můžeme hypotetizovat, že zvýšené hladiny oxidativního stresu mohly u buněk linie Bowes působit jako potenciační

faktor k na p53 závislé signalizaci, zatímco u buněk linie SK-Mel-28 byl jejich vliv na p53 závislou signalizaci inhibiční, což bylo ostatně naznačeno jinými výzkumnými skupinami (61).

Specifická přítomnost typických, s mitochondriemi interagujících proapoptotických i antiapoptotických proteinů u exponovaných melanomových buněk nás navedla k ověření mechanismů mitochondriální apoptotické dráhy včetně aktivace kaspáz. Podle předpokladů jsme zaznamenali opožděný pokles mitochondriálního membránového potenciálu a významnou aktivaci exekučních kaspáz, a to u obou melanomových linií. U buněk linie SK-Mel-28 však byly tyto jevy významně méně intenzivnější. Vzhledem k těmto výsledkům se tyto odlišnosti dají vysvětlit následujícím způsobem: inhibitory topoisomeráz indukovaly u buněk linie Bowes klasickou, na p53 závislou odpověď, což jsme dále prokázali při použití specifického inhibitoru p53 Pifitrinu- α . Jako amplifikační faktor zde mohla působit také aktivace kaspázy-2, která s největší pravděpodobností interaguje s proteinem p53 (72), a která nebyla aktivována u buněk SK-Mel-28. Dalším potencujícím mechanismem mohlo být specifické na kaspáze-8 závislé štěpení proteinu BID a jeho následná translokace do mitochondrií. Role oxidativního stresu je v této oblasti nevyjasněná, protože antioxidant NAC nedokázal zabránit apoptóze u buněk linie Bowes. Naopak u buněk linie SK-Mel-28 hrál oxidativní stres významnou úlohu jak je patrné z účinného snížení úrovně apoptózy po použití NAC.

Celkově se tedy zdá, že kombinace dvou inhibitorů odlišných topoisomeráz vykazuje významný účinek u různých linií maligního melanomu prostřednictvím odlišných, ale flexibilních mechanismů a tento přístup je tedy vhodnou platformou pro další experimentální studie i pro potenciální preklinický a klinický výzkum tohoto nádorového onemocnění.

7. ZÁVĚRY

Na základě experimentálních výsledků je možno obecně formulovat tyto závěry:

- 1) U testovaných buněčných linií lidského melanomu Bowes, WM-115, A2058 a SK-Mel-28 byla prokázána exprese topoisomeráz I a II α , přičemž míra exprese obou enzymů se u jednotlivých linií lišila. Nejvyšší exprese byla prokázána u buněk linie Bowes a A2058 a naopak nejméně exprimovaly topoisomerázy buňky linie WM-115. Tento odlišný expresní profil je možné korelovat se stupněm malignity jednotlivých linií. Spolu se stupňující se progresí melanomu stoupá i exprese topoisomeráz (Bowes – vysoce maligní a vysoká exprese topoisomeráz, WM-115 – relativně nízký stupeň malignity a nízká exprese topoisomeráz), i když dle dostupných histopatologických studií toto pravidlo neplatí absolutně.
- 2) Inhibitor topoisomerázy I kamptotecin vykazuje na dávce závislou cytotoxicitu u melanomových linií s divokou formou genu tp53 (Bowes, WM-115, A2058) a indukuje mitochondriální a na kaspáze závislou apoptózu. Aktivace této buněčné smrti může probíhat v počátečních stádiích několika propojenými mechanismy zahrnujícími nejenom signalizaci mezi proteinem p53 a mitochondriemi, ale také komunikaci mezi proteinem p73 a mediátory aktivace kaspázy-2, které mohou sloužit jako významné zesilující elementy. Klíčovým krokem této etapy je potom translokace proteinu p53 a snad i na p53 a p73 závislá translokace proteinů BAX, PUMA a Noxa do mitochondrií. Odlišná aktivita těchto molekul a odlišnosti v expresních profilech dalších proapoptotických a antiapoptotických proteinů odhalují jedinečnost jednotlivých melanomových linií a s velkou pravděpodobností i případných klinických vzorků.
- 3) Inhibitor topoisomerázy II α etoposid inhibuje růst a proliferaci melanomových buněk linie Bowes, a to v závislosti na čase působení a použité dávce. Obecně je jeho cytotoxicita poněkud nižší než u kamptotecinu. Etoposid také vyvolává mitochondriální na kaspázách závislou apoptózu. Její aktivace probíhá prostřednictvím tzv. DNA-damage pathway zahrnující ATM kinázu a protein p53, ale také nezávislou cestou prostřednictvím kaspázy-2. Mitochondrie jsou v průběhu tohoto procesu významným cílovým kompartmentem a jejich odpověď na působení

etoposidu je bifázická. Exekuční fáze etoposidem stimulované apoptózy zahrnuje aktivaci kaspázy-2, kaspázy-9 a kaspázy-3.

- 4) Kombinace inhibitorů topoisomeráz I a II α (kamptotecin a etoposid) vykazuje výraznou cytotoxicitu u buněk lidského melanomu, a to nezávisle na stavu genu tp53 (mutovaný a nemutovaný). Tato kombinace však indukuje apoptózu různými mechanismy, kdy u buněk linie Bowes (nemutovaný gen tp53) je aktivována mitochondriální buněčná smrt charakterizovaná aktivitou kaspáz, zatímco u buněk linie SK-Mel-28 (mutovaný gen tp53) je tato buněčná smrt stimulována oxidativním stresem navozenou aktivací stresových kináz p38 a JNK. Tyto výsledky jasně ukazují, že simultánní inhibice dvou topoisomeráz u buněk maligního melanomu významně zvyšuje cytotoxicitu a navozuje apoptózu i u buněk, které akumulovaly mutace v klíčových mediátorech buněčného stresu (tp53). Tato strategie by tedy měla být do budoucna dále zkoumána, a to nejenom v modelech *in vitro*, ale i *in vivo*.

Závěrem je třeba zdůraznit, že tato práce si nekladla za cíl studium chemoterapie maligního melanomu v bezprostřední návaznosti na klinickou praxi. Hlavním účelem práce byly hlubší sondy do biologie specifické, stresem navozené signalizace maligních melanocytů vybraných lidských melanomových linií a pokus o pochopení aktivace konkrétních mediátorů buněčné smrti po ovlivnění modelovými cytostatiky.

8. SEZNAM LITERATURY

1. **Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J, and a. kolektiv.** 2008. Hematologie. Přehled maligních hematologických nemocí, 2., doplněné a zcela přepracované vydání ed. Grada, Praha.390.
2. **Arun, B., and E. P. Frenkel.** 2001. Topoisomerase I inhibition with topotecan: pharmacologic and clinical issues. *Expert Opin Pharmacother* **2**:491-505.
3. **Ashkenazi, A.** 2008. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov* **7**:1001-12.
4. **Ashkenazi, A.** 2008. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**:325-31.
5. **Bae, I., M. L. Smith, M. S. Sheikh, Q. Zhan, D. A. Scudiero, S. H. Friend, P. M. O'Connor, and A. J. Fornace, Jr.** 1996. An abnormality in the p53 pathway following gamma-irradiation in many wild-type p53 human melanoma lines. *Cancer Res* **56**:840-7.
6. **Bailly, C.** 2000. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* **7**:39-58.
7. **Baldwin, E. L., and N. Osheroff.** 2005. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **5**:363-72.
8. **Barker, N., and H. Clevers.** 2000. Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays* **22**:961-5.
9. **Belšan I.** Doporučené postupy pro praktické lékaře. Vybrané nádory kůže.
10. **Bhatt, K. V., L. S. Spofford, G. Aram, M. McMullen, K. Pumiglia, and A. E. Aplin.** 2005. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. *Oncogene* **24**:3459-71.
11. **Bohm, M., G. Moellmann, E. Cheng, M. Alvarez-Franco, S. Wagner, P. Sassone-Corsi, and R. Halaban.** 1995. Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ* **6**:291-302.
12. **Bowen, A. R., A. N. Hanks, S. M. Allen, A. Alexander, M. J. Diedrich, and D. Grossman.** 2003. Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *J Invest Dermatol* **120**:48-55.
13. **Box, N. F., and T. Terzian.** 2008. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**:525-33.

14. **Cerroni, L., H. P. Soyer, and H. Kerl.** 1995. Bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* **17**:7-11.
15. **Cichorek, M., K. Kozłowska, and E. Bryl.** 2007. The activity of caspases in spontaneous and camptothecin-induced death of melanotic and amelanotic melanoma cell. *Cancer Biol Ther* **6**:346-53.
16. **Cichorek, M., K. Kozłowska, and E. Bryl.** 2007. Mitochondrial transmembrane potential in spontaneous and camptothecin-induced apoptosis of melanotic and amelanotic melanoma cells. *Neoplasma* **54**:29-36.
17. **Cohen, C., A. Zavala-Pompa, J. H. Sequeira, M. Shoji, D. G. Sexton, G. Cotsonis, F. Cerimele, B. Govindarajan, N. Macaron, and J. L. Arbiser.** 2002. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* **8**:3728-33.
18. **Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal.** 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**:949-54.
19. **de Vries, E., F. I. Bray, A. M. Eggermont, and J. W. Coebergh.** 2004. Monitoring stage-specific trends in melanoma incidence across Europe reveals the need for more complete information on diagnostic characteristics. *Eur J Cancer Prev* **13**:387-95.
20. **Dolan, M. E., B. Frydman, C. B. Thompson, A. M. Diamond, B. J. Garbiras, A. R. Safa, W. T. Beck, and L. J. Marton.** 1998. Effects of 1,2-naphthoquinones on human tumor cell growth and lack of cross-resistance with other anticancer agents. *Anticancer Drugs* **9**:437-48.
21. **Elmore, S.** 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**:495-516.
22. **Finucane, D. M., N. J. Waterhouse, G. P. Amarante-Mendes, T. G. Cotter, and D. R. Green.** 1999. Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Exp Cell Res* **251**:166-74.

23. **Fischer, B., and A. Arcaro.** 2008. Current status of clinical trials for small cell lung cancer. *Rev Recent Clin Trials* **3**:40-61.
24. **Fu, X., S. Wan, Y. L. Lyu, L. F. Liu, and H. Qi.** 2008. Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS One* **3**:e2009.
25. **Garbe, C., P. Buttner, J. Bertz, G. Burg, B. d'Hoedt, H. Drepper, I. Guggenmoos-Holzmann, W. Lechner, A. Lippold, C. E. Orfanos, and et al.** 1995. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* **75**:2484-91.
26. **Garraway, L. A., H. R. Widlund, M. A. Rubin, G. Getz, A. J. Berger, S. Ramaswamy, R. Beroukhim, D. A. Milner, S. R. Granter, J. Du, C. Lee, S. N. Wagner, C. Li, T. R. Golub, D. L. Rimm, M. L. Meyerson, D. E. Fisher, and W. R. Sellers.** 2005. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**:117-22.
27. **Garrido, C., J. M. Bruey, A. Fromentin, A. Hammann, A. P. Arrigo, and E. Solary.** 1999. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J* **13**:2061-70.
28. **Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, and R. Marais.** 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**:851-7.
29. **Gray-Schopfer, V. C., S. da Rocha Dias, and R. Marais.** 2005. The role of B-RAF in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24**:165-83.
30. **Greenlee, R. T., M. B. Hill-Harmon, T. Murray, and M. Thun.** 2001. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* **51**:15-36.
31. **Grossman, D., and D. C. Altieri.** 2001. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev* **20**:3-11.
32. **Gulati, A. P., Y. M. Yang, D. Harter, A. Mukhopadhyay, B. B. Aggarwal, D. L. Benzil, J. Whysner, A. P. Albino, R. Murali, and M. Jhanwar-Uniyal.** 2006. Mutant human tumor suppressor p53 modulates the activation of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB, but not c-Jun N-terminal kinase and activated protein-1. *Mol Carcinog* **45**:26-37.
33. **Gupta, M., A. Fujimori, and Y. Pommier.** 1995. Eukaryotic DNA topoisomerases I. *Biochim Biophys Acta* **1262**:1-14.
34. **Hartmann, J. T., and H. P. Lipp.** 2006. Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Saf* **29**:209-30.

35. **Helmbach, H., M. A. Kern, E. Rossmann, K. Renz, C. Kissel, B. Gschwendt, and D. Schadendorf.** 2002. Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency. *J Invest Dermatol* **118**:923-32.
36. **Hengartner, M. O.** 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770-6.
37. **Hishita, T., S. Tada-Oikawa, K. Tohyama, Y. Miura, T. Nishihara, Y. Tohyama, Y. Yoshida, T. Uchiyama, and S. Kawanishi.** 2001. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res* **61**:2878-84.
38. **Holden, J. A.** 2001. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **1**:1-25.
39. **http://www.linkos.cz/pacienti/melanom_clanek.php.**
40. **<http://www.melanomy.cz/?touch=malignimelanom>.**
41. **<http://www.melanomy.cz/?touch=matemelanom>.**
42. **<http://www.mou.cz/cz/informace-pro-praktickeho-lekare/article.html?id=87>.**
43. **http://www.uzis.cz/download.php?ctg=20&search_name=melanom®ion=100.**
44. **Huntington, J. T., J. M. Shields, C. J. Der, C. A. Wyatt, U. Benbow, C. L. Slingluff, Jr., and C. E. Brinckerhoff.** 2004. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem* **279**:33168-76.
45. **Hynie, S.** 2003. Speciální farmakologie – Díl VII/A. Protinádorová chemoterapeutika a imunomodulační látky. Karolinum, Praha.166.
46. **Champoux, J. J.** 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**:369-413.
47. **Chen, X., Y. Zheng, J. Zhu, J. Jiang, and J. Wang.** 2001. p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73. *Oncogene* **20**:769-74.
48. **Igney, F. H., and P. H. Krammer.** 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**:277-88.
49. **Ivanov, V. N., A. Bhoumik, and Z. Ronai.** 2003. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* **22**:3152-61.
50. **Johnstone, R. W., A. A. Ruefli, and S. W. Lowe.** 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**:153-64.

51. **Karpinich, N. O., M. Tafani, R. J. Rothman, M. A. Russo, and J. L. Farber.** 2002. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **277**:16547-16552.
52. **Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe.** 2005. Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review). *Oncol Rep* **14**:595-9.
53. **Kissel, C. K., D. Schadendorf, and H. Rockmann.** 2006. The altered apoptotic pathways in cisplatin and etoposide-resistant melanoma cells are drug specific. *Melanoma Res* **16**:527-35.
54. **Klener, P.** 2002. *Klinická onkologie*. Galén, Praha.686.
55. **Kroemer, G.** 2003. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **304**:433-5.
56. **Lage, H., H. Helmbach, M. Dietel, and D. Schadendorf.** 2000. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br J Cancer* **82**:488-91.
57. **Larsen, A. K., A. E. Escargueil, and A. Skladanowski.** 2003. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* **99**:167-81.
58. **Levy, C., M. Khaled, and D. E. Fisher.** 2006. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* **12**:406-14.
59. **Li, G., J. A. Bush, and V. C. Ho.** 2000. p53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin. *J Invest Dermatol* **114**:514-9.
60. **Li, G., L. Tang, X. Zhou, V. Tron, and V. Ho.** 1998. Chemotherapy-induced apoptosis in melanoma cells is p53 dependent. *Melanoma Res* **8**:17-23.
61. **Liu, B., Y. Chen, and D. K. St Clair.** 2008. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med* **44**:1529-35.
62. **Ly, J. D., D. R. Grubb, and A. Lawen.** 2003. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **8**:115-28.
63. **Lynch, B. J., G. Komaromy-Hiller, I. B. Bronstein, and J. A. Holden.** 1998. Expression of DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II-alpha, and p53 in metastatic malignant melanoma. *Hum Pathol* **29**:1240-5.
64. **Melino, G., F. Bernassola, M. Ranalli, K. Yee, W. X. Zong, M. Corazzari, R. A. Knight, D. R. Green, C. Thompson, and K. H. Vousden.** 2004. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* **279**:8076-83.

65. **Mhaidat, N. M., Y. Wang, K. A. Kiejda, X. D. Zhang, and P. Hersey.** 2007. Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2. *Mol Cancer Ther* **6**:752-61.
66. **Miao, Z. H., A. Player, U. Shankavaram, Y. H. Wang, D. B. Zimonjic, P. L. Lorenzi, Z. Y. Liao, H. Liu, T. Shimura, H. L. Zhang, L. H. Meng, Y. W. Zhang, E. S. Kawasaki, N. C. Popescu, M. I. Aladjem, D. J. Goldstein, J. N. Weinstein, and Y. Pommier.** 2007. Nonclassic functions of human topoisomerase I: genome-wide and pharmacologic analyses. *Cancer Res* **67**:8752-61.
67. **Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi, and D. S. Peeper.** 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**:720-4.
68. **Montecucco, A., and G. Biamonti.** 2007. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* **252**:9-18.
69. **Morris, S. D.** 2002. Heat shock proteins and the skin. *Clin Exp Dermatol* **27**:220-4.
70. **Mu, X. C., T. A. Tran, J. S. Ross, and J. A. Carlson.** 2000. Topoisomerase II-alpha expression in melanocytic nevi and malignant melanoma. *J Cutan Pathol* **27**:242-8.
71. **Murakami, T., S. Toda, M. Fujimoto, M. Ohtsuki, H. R. Byers, T. Etoh, and H. Nakagawa.** 2001. Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* **288**:8-15.
72. **Niida, H., and M. Nakanishi.** 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**:3-9.
73. **Omholt, K., D. Krockel, U. Ringborg, and J. Hansson.** 2006. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* **16**:197-200.
74. **Omholt, K., A. Platz, U. Ringborg, and J. Hansson.** 2001. Cytoplasmic and nuclear accumulation of beta-catenin is rarely caused by CTNNB1 exon 3 mutations in cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer* **92**:839-42.
75. **Oppermann, M., C. C. Geilen, L. F. Fecker, B. Gillissen, P. T. Daniel, and J. Eberle.** 2005. Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk / Bik. *Oncogene* **24**:7369-80.
76. **Pamment, J., E. Ramsay, M. Kelleher, D. Dornan, and K. L. Ball.** 2002. Regulation of the IRF-1 tumour modifier during the response to genotoxic stress involves an ATM-dependent signalling pathway. *Oncogene* **21**:7776-85.

77. **Perlis, C., and M. Herlyn.** 2004. Recent advances in melanoma biology. *Oncologist* **9**:182-7.
78. **Polakis, P.** 2001. More than one way to skin a catenin. *Cell* **105**:563-6.
79. **Qin, J. Z., L. Stennett, P. Bacon, B. Bodner, M. J. Hendrix, R. E. Seftor, E. A. Seftor, N. V. Margaryan, P. M. Pollock, A. Curtis, J. M. Trent, F. Bennett, L. Miele, and B. J. Nickoloff.** 2004. p53-independent NOXA induction overcomes apoptotic resistance of malignant melanomas. *Mol Cancer Ther* **3**:895-902.
80. **Rass, K., and J. C. Hassel.** 2009. Chemotherapeutics, chemoresistance and the management of melanoma. *G Ital Dermatol Venereol* **144**:61-78.
81. **Read, S. H., B. C. Baliga, P. G. Ekert, D. L. Vaux, and S. Kumar.** 2002. A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol* **159**:739-45.
82. **Reifenberger, J., C. B. Knobbe, M. Wolter, B. Blaschke, K. W. Schulte, T. Pietsch, T. Ruzicka, and G. Reifenberger.** 2002. Molecular genetic analysis of malignant melanomas for aberrations of the WNT signaling pathway genes CTNNB1, APC, ICAT and BTRC. *Int J Cancer* **100**:549-56.
83. **Roos, W. P., and B. Kaina.** 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**:440-50.
84. **Rubinfeld, B., P. Robbins, M. El-Gamil, I. Albert, E. Porfiri, and P. Polakis.** 1997. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* **275**:1790-2.
85. **Rudolf, E., and M. Cervinka.** 2003. Topoisomerases and tubulin inhibitors: a promising combination for cancer treatment. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3**:421-9.
86. **Ryan, D., M. Rafferty, S. Hegarty, P. O'Leary, W. Faller, G. Gremel, M. Bergqvist, M. Agnarsdottir, S. Stromberg, C. Kampf, F. Ponten, R. C. Millikan, P. A. Dervan, and W. M. Gallagher.** 2010. Topoisomerase I amplification in melanoma is associated with more advanced tumours and poor prognosis. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**:542-53.
87. **Sarasin, A., and P. Dessen.** 2010. DNA repair pathways and human metastatic malignant melanoma. *Curr Mol Med* **10**:413-8.
88. **Satyamoorthy, K., N. H. Chehab, M. J. Waterman, M. C. Lien, W. S. El-Deiry, M. Herlyn, and T. D. Halazonetis.** 2000. Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells. *Cell Growth Differ* **11**:467-74.

89. **Selimovic, D., M. Hassan, Y. Haikel, and U. R. Hengge.** 2008. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2. *Cell Signal* **20**:311-22.
90. **Selzer, E., H. Schlagbauer-Wadl, I. Okamoto, H. Pehamberger, R. Potter, and B. Jansen.** 1998. Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res* **8**:197-203.
91. **Serrone, L., and P. Hersey.** 1999. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res* **9**:51-8.
92. **Sharma, A., N. R. Trivedi, M. A. Zimmerman, D. A. Tuveson, C. D. Smith, and G. P. Robertson.** 2005. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* **65**:2412-21.
93. **Shaw, R. J., and L. C. Cantley.** 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**:424-30.
94. **Schuler, M., and D. R. Green.** 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions* **29**:684-8.
95. **Slominski, A., D. J. Tobin, S. Shibahara, and J. Wortsman.** 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* **84**:1155-228.
96. **Smalley, K. S., N. K. Haass, P. A. Brafford, M. Lioni, K. T. Flaherty, and M. Herlyn.** 2006. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther* **5**:1136-44.
97. **Soengas, M. S., P. Capodici, D. Polsky, J. Mora, M. Esteller, X. Opitz-Araya, R. McCombie, J. G. Herman, W. L. Gerald, Y. A. Lazebnik, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe.** 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**:207-11.
98. **Stahl, J. M., A. Sharma, M. Cheung, M. Zimmerman, J. Q. Cheng, M. W. Bosenberg, M. Kester, L. Sandirasegarane, and G. P. Robertson.** 2004. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* **64**:7002-10.
99. **Švihovec, J., and H. Novotná.** 2001. *Pharminindex Kompendium*. MediMedia Information, Praha.1802.

100. **Tang, L., V. A. Tron, J. C. Reed, K. J. Mah, M. Krajewska, G. Li, X. Zhou, V. C. Ho, and M. J. Trotter.** 1998. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* **4**:1865-71.
101. **Tanizawa, A., M. Kubota, H. Hashimoto, T. Shimizu, T. Takimoto, T. Kitoh, Y. Akiyama, and H. Mikawa.** 1989. VP-16-induced nucleotide pool changes and poly(ADP-ribose) synthesis: the role of VP-16 in interphase death. *Exp Cell Res* **185**:237-46.
102. **Thornberry, N. A., and Y. Lazebnik.** 1998. Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-6.
103. **Tsao, H., V. Goel, H. Wu, G. Yang, and F. G. Haluska.** 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* **122**:337-41.
104. **Tsutsumi, S., and L. Neckers.** 2007. Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci* **98**:1536-9.
105. **Urist, M., T. Tanaka, M. V. Poyurovsky, and C. Prives.** 2004. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev* **18**:3041-54.
106. **Van Laethem, A., K. Nys, S. Van Kelst, S. Claerhout, H. Ichijo, J. R. Vandenheede, M. Garmyn, and P. Agostinis.** 2006. Apoptosis signal regulating kinase-1 connects reactive oxygen species to p38 MAPK-induced mitochondrial apoptosis in UVB-irradiated human keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine* **41**:1361-1371.
107. **Wang, L., and D. A. Eastmond.** 2002. Catalytic inhibitors of topoisomerase II are DNA-damaging agents: induction of chromosomal damage by merbarone and ICRF-187. *Environ Mol Mutagen* **39**:348-56.
108. **Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer.** 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**:727-30.
109. **Wellbrock, C., and R. Marais.** 2005. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol* **170**:703-8.
110. **Wellbrock, C., C. Weisser, E. Geissinger, J. Troppmair, and M. Scharf.** 2002. Activation of p53(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* **277**:6443-54.

111. **Wittgen, H. G., and L. C. van Kempen.** 2007. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res* **17**:400-9.
112. **Wu, H., V. Goel, and F. G. Haluska.** 2003. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**:3113-22.
113. **Yamashita, T., T. Tokino, H. Tonoki, T. Moriuchi, H. Y. Jin, F. Omori, and K. Jimbow.** 2001. Induction of apoptosis in melanoma cell lines by p53 and its related proteins. *J Invest Dermatol* **117**:914-9.
114. **Yang, X., W. Li, E. D. Prescott, S. J. Burden, and J. C. Wang.** 2000. DNA topoisomerase IIbeta and neural development. *Science* **287**:131-4.
115. **Záruba, F., V. Vosmík, J. Záhejský, J. Buchvald, and L. Jirásek.** 1994. *Dermatovenerologie. Scientia medica, Praha.*247.
116. **Zhivotovsky, B., and S. Orrenius.** 2005. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:859-67.
117. **Zimmermann, K. C., C. Bonzon, and D. R. Green.** 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **92**:57-70.