

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA BIOCHEMIE



**Studium expresního profilu neuroblastomové buněčné  
linie UKF-NB-4 rezistentní na ellipticin**

**Study of Gene Expression Profile of Ellipticine-resistant Neuroblastoma**

**Cell Line UKF-NB-4**

Bakalářská práce

Michael Pinkas

Školitelka: RNDr. Jitka Poljaková, Ph.D.

Praha 2012

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem pracoval samostatně pod vedením školitelky RNDr. Jitky Poljakové, Ph.D. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citoval.

V Praze dne .....

.....

Michael Pinkas

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych na tomto místě poděkoval své školitelce RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za velmi cenné konzultace během psaní této bakalářské práce.

Dále bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. z Kliniky dětské hematologie a onkologie v pražském Motole za poskytnutí experimentálních dat ke zpracování.

## ABSTRAKT

Neuroblastom (NB) je maligní embryonální nádor periferního sympatického nervového systému odvozeného od neurální lišty a nejčastější nádor u dětí do jednoho roku života. Pokud je amplifikován protoonkogen *MYCN* u NB vysokého rizika, současná protinádorová terapie selhává zejména kvůli vzniku rezistence. Ellipticin (ELLI) je potenciální kancerostatikum, jehož cytotoxický účinek je založen především na inhibici topoisomerasy II, interkalaci do struktury dvojšroubovice DNA a tvorbě aduktů s DNA po enzymatické aktivaci cytochromy P450, peroxidasami, sulfotransferasami a N,O-acetyltransferasami.

Dlouhodobá kultivace buněčné linie UKF-NB-4 s ellipticinem vedla ke vzniku rezistence, která je multifaktoriální. (i) Ukazuje se, že ELLI není z linie rezistentní na ELLI (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>) vylučován jako doxorubicin při vzniku rezistence v UKF-NB-4, ale je transportován z jádra a sekvestrován v intracelulárních kompartmentech. Cytotoxicitu ELLI také snižuje (ii) nízké intracelulární pH v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> a (iii) snížená exprese topoisomerasy II. (iv) Expese enzymů aktivujících ELLI zůstala nezměněná na úrovni mRNA detekované metodou „DNA microarray“, pomocí qRT-PCR již však byla pozorována zvýšená expese enzymů aktivujících ELLI cytochromu P450 3A4 a cyklooxygenasy-1. Navíc expese cytochromu b<sub>5</sub> se zvýšila, čímž se zvyšuje účinnost aktivace ELLI pomocí enzymů cytochromů P450 1A1/2 a 3A4. (v) Expese protoonkogenu *MYCN* se sice snížila, po dlouhodobější kultivaci UKF-NB-4 s ELLI ale došlo k narušení zpětnovazebné autoregulace expese *MYCN* a je indukována translokace proteinu *MYCN* zpět z cytosolu do jádra. (vi) Dochází také ke snížení apoptózy indukované ELLI a ke snížení proliferace. Zároveň buňky linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> částečně diferencují. (vii) Linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> navíc indukuje angiogenezi a má vyšší metastatický potenciál než parentální linie UKF-NB-4.

Pomocí expresního profilu linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči parentální linii lze tedy zjistit, že přístup ELLI k cílům svého cytotoxického účinku je omezen, zároveň je podpořen maligní fenotyp UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>. Překvapivě expese enzymů aktivujících ellipticin se nesnížila a u některých se dokonce zvýšila.

**Klíčová slova:** neuroblastom, ellipticin, mechanismus rezistence, expresní profilování, protinádorové léčivo

## ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is a malignant embryonal tumor of the peripheral sympathetic nervous system derived from neural crest and is the most common tumor in infants. If the protooncogen *MYCN* is amplified in the case of high risk neuroblastoma, the current therapy fails. The biggest issue is the development of resistance. Ellipticine (ELLI) is a potential antineoplastic drug, whose cytotoxic effect is mainly based on the inhibition of topoisomerase II, its intercalation into the double helix structure of DNA and formation of adducts with DNA after enzymatic activation by cytochromes P450, peroxidases, sulfotransferases and N,O-acetyltransferases.

Long-term cultivation of NB cell line UKF-NB-4 with ELLI leads to resistance, which is multifactorial. (i) It appears that ELLI is not effluxed from cells of the line UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> as in the case of doxorubicin resistance in UKF-NB-4, but is transported from the nucleus and sequestered in intracellular compartments. Cytotoxicity of ELLI is reduced also by (ii) low intracellular pH and (iii) decreased expression of topoisomerase II. (iv) Expression of enzymes activating ELLI is unchanged on the mRNA level detected by DNA microarray. However, enhanced expression of enzymes activating ELLI (cytochrome P450 3A4 and cyclooxygenase-1) is detected by qRT-PCR. Moreover expression of cytochrome b<sub>5</sub>, which enhances the efficiency of activation of ELLI with cytochromes P450 1A1/2 and 3A4, is increased. (v) Expression of *MYCN* is reduced. However, in the second stage of cultivation UKF-NB-4 cells with ELLI there is a disruption of self-expression feedback of *MYCN* and the translocation of MYCN protein back into the nucleus is induced. (vi) There is reduced apoptosis induced by ELLI and reduced proliferation. At the same time the cells partially differentiate. (vii) UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> cells resistant to ELLI induce angiogenesis and have higher metastatic potential than the parental line UKF-NB-4.

Using gene expression profiling of the cells UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> (in comparison to parental line) may therefore determine that access to the targets of cytotoxic action of ELLI is limited and the malignant phenotype of UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> is supported. Surprisingly, expression of enzymes activating ELLI has not decreased, and some even increased. (*In Czech*)

**Keywords:** neuroblastoma, ellipticine, mechanism of resistance, expression profiling, anticancer drug

## OBSAH

	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	6
<b>1.</b>	<b>ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY</b>	9
1.1.	Charakteristické znaky nádorové buňky	10
1.2.	Mechanismy rezistence	14
1.3.	Neuroblastom	15
1.3.1.	Genetická charakterizace neuroblastomu	16
1.3.2.	Klinická stádia neuroblastomu a současná terapie	19
1.4.	Ellipticin	21
1.4.1.	Mechanismus cytotoxicity ellipticinu	21
1.4.2.	Mechanismus apoptózy indukované ellipticinem	24
1.4.3.	Cytotoxicita ellipticinu vůči neuroblastomovým buněčným liniím	25
1.4.4.	Neuroblastomová linie UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin	26
1.5.	Expresní profilování technikou „DNA microarray“	26
<b>2.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	29
<b>3.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	30
3.1.	Genetický profil linie UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin	32
3.2.	Změny exprese genů metabolisujících ellipticin v linii UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> ve srovnání s parentální linií	35
3.3.	Změny exprese genů v závislosti na amplifikaci <i>MYCN</i> v linii UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> ve srovnání s parentální linií	38
3.4.	Změny exprese apoptotických genů v linii UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> ve srovnání s parentální linií	41
3.5.	Změny exprese genů ovlivňujících neurodiferenciaci v linii UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> ve srovnání s parentální linií	44
3.6.	Změny exprese genů ovlivňujících buněčný cyklus a proliferaci v linii UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> ve srovnání s parentální linií	48
3.7.	Změny exprese genů ovlivňujících angiogenezi a metastázování v linii UKF-NB-4 <sup>ELLI</sup> ve srovnání s parentální linií	50
<b>4.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	52

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>aaUTP</b>	5-(3-aminoallyl)-UTP
<b>ABC</b>	<i>ATP-binding cassette</i>
<b>aMIF</b>	<i>antisenseMIF</i>
<b>ANG</b>	angiopoetin
<b>aRNA</b>	<i>antisenseRNA</i>
<b>ATM</b>	ataxia telangiectasia mutated
<b>ATR</b>	ataxia telangiectasia and Rad3 related
<b>BCL2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BER</b>	„excizní“ oprava bází (base excision repair)
<b>bHLH-LZ</b>	<i>basic helix-loop-helix/leucinezipper</i>
<b>CADM</b>	molekula buněčné adheze
<b>CCND1</b>	cyklin D1
<b>CDH2</b>	N-kadherin
<b>CGH</b>	komparativní genomová hybridizace
<b>COL</b>	kolagen
<b>COX</b>	cyklooxygenasa
<b>CYB5</b>	cytochrom b <sub>5</sub>
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>DAVID</b>	<i>Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery</i>
<b>DM</b>	<i>double minutes chromatin bodies</i>
<b>DOXO</b>	doxorubicin
<b>ECM</b>	extracelulární matrix
<b>EMT</b>	přeměna z epiteliální na mezenchymální buňku
<b>ER</b>	endoplazmatické retikulum
<b>FAF1</b>	faktor asociovaný s Fas
<b>FC</b>	násobná změna ( <i>fold change</i> )
<b>FISH</b>	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<b>HDAC</b>	histondeacetylase
<b>HH</b>	<i>Hedgehog</i>

<b>HR-NB</b>	neuroblastom vysokého rizika ( <i>high risk neuroblastoma</i> )
<b>HSR</b>	<i>homogeneously staining region</i>
<b>IAP/BIRP</b>	<i>inhibitors of apoptosis/baculoviral IAP repeat containing protein</i>
<b>iFISH</b>	<i>immunofluorescence in situ hybridization</i>
<b>INSS</b>	<i>International Neuroblastoma Staging Systém</i>
<b>IVT</b>	<i>in vitro</i> transkripce
<b>LDH</b>	laktátdehydrogenasa
<b>LPO</b>	laktoperoxidasa
<b>LRP</b>	<i>lung resistance-related protein</i>
<b>MADD</b>	<i>MAP-kinase activating death domain</i>
<b>MCT</b>	monokarboxylátový transportér
<b>MDR</b>	<i>multidrug resistance</i>
<b>MFO</b>	oxidasy se smíšenou funkcí
<b>MIF</b>	inhibiční faktor migrace makrofágů
<b>miRNA</b>	<i>microRNA</i>
<b>MM</b>	<i>mismatch</i>
<b>MPO</b>	myeloperoxidasa
<b>MRP</b>	<i>multidrug resistance associated protein</i>
<b>MYCN</b>	<i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)</i>
<b>NAT</b>	N,O-acetyltransferasa
<b>NB</b>	neuroblastom
<b>NCAM</b>	neuronální molekula buněčné adheze
<b>NER</b>	„excizní“ oprava nukleotidů ( <i>nucleotide excision repair</i> )
<b>NGF</b>	nervový růstový faktor
<b>p53</b>	„tumor supresorový“ protein p53
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>P-gp</b>	P-glykoprotein
<b>PM</b>	<i>perfect match</i>
<b>POR</b>	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
<b>pRb</b>	retinoblastomový protein



<b>PRDX</b>	peroxiredoxin
<b>RT</b>	reversní transkriptasa
<b>SAGE</b>	sériová analýza genové exprese
<b>SOD</b>	superoxiddismutasa
<b>SULT</b>	sulfotransferasa
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<b>TIMP</b>	inhibitor metaloproteasy
<b>TOP</b>	topoisomerasa
<b>TSP</b>	thrombospondin
<b>vRNA</b>	„trezorová“ RNA ( <i>vaultRNA</i> )
<b>V-ATP</b>	vakuolární ATPasa
<b>WNT</b>	<i>wingless type</i>

## 1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejzávažnějších problémů současné společnosti. V ekonomicky vyspělých zemích je rakovina jednou z hlavních příčin úmrtí. *(Jemal 2011)* V České republice postihuje v průběhu života každého třetího občana a je příčinou každého čtvrtého úmrtí. Nádory se dnes objevují u jedinců každého věku – od narození po stáří. *(Koutecký 2004)* Častý výskyt nádorových onemocnění je způsoben především delším průměrným věkem života, kontaminací životního prostředí a odlišným životním stylem oproti minulosti (nevhodná strava, stres, kouření). *(Stiborová 2004b a Klener 2010)*

Vznik nádorového onemocnění je složitý, vícestupňový proces. Při iniciaci karcinogeneze dochází k mutacím DNA, které vedou k aktivaci onkogenů a deaktivaci „tumor supresorových“ genů. Pokud tyto genetické změny přetrvávají, v promoční fázi dochází k poruchám diferenciaci a k proliferaci buněk, čímž vzniká benigní nádor. V progresní fázi je poté dovršena maligní transformace nádorových buněk, jejichž růst se stává nekontrolovatelným. Nádorové buňky mohou navíc infiltrovat do ostatních tkání, kde vytváří dceřinné nádory, metastázy. *(Stiborová 2004b)*

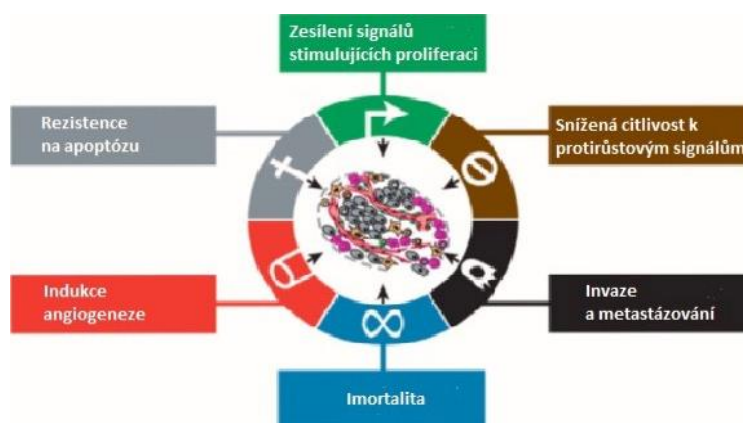
Jedinou protinádorovou terapií byla do počátku 20. století léčba chirurgická. S objevem rentgenových paprsků došlo k vývoji radioterapie. Teprve ve 40. letech 20. století se začala pomalu uplatňovat nová strategie protinádorové léčby – chemoterapie, která se v průběhu dalších desetiletí stala jednou z hlavních léčebných metod. V současné době se využívá tzv. multimodální léčba, tedy vzájemná kombinace různých metod protinádorové léčby. *(Klener 2010)*

Pokroky v biomedicínských oborech přispívají k objasňování mechanismů karcinogeneze, což umožňuje zaměřit terapii více cíleně. Po rozluštění lidského genomu a díky rychlému vývoji v oblastech genetiky, makromolekulární chemie nebo nanotechnologií se otevírají nové cesty léčby – např. genová terapie nebo enkapsulace chemoterapeutik do nanočástic. *(Klener 2010)*

## 1.1. CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY NÁDOROVÉ BUŇKY

Vznik nádorové buňky je výsledkem dlouhého procesu, kdy dochází k hromadění genetických změn. Jedná se většinou o čtyři až jedenáct genetických alterací. (Koutecký 2004) Maligní buňka se vyznačuje podle Hanahana a Weinberga šesti základními vlastnostmi (obr. 1) (Hanahan 2000): (i) zesílení signálů stimulujičích proliferaci, (ii) snížení citlivosti k signálům potlačujícím růst, (iii) rezistence na apoptózu, (iv) imortalizace, (v) invazivita a metastázování a (vi) angiogeneze. Tyto znaky pravděpodobně sdílí všechny lidské nádory. (Hanahan 2000)

(i) Snížená závislost na mitogenních podnětech může být u nádorových buněk způsobena autokrinní stimulací růstu pomocí růstových faktorů. Další modifikace se týkají růstových receptorů. Dochází buď k jejich zmnožení na povrchu buňky, potom je aktivace možná i při podprahových koncentracích růstových faktorů, nebo dochází k aktivaci receptorů nezávisle na vazbě ligandu. (Koutecký 2004, Hanahan 2000)



**Obrázek 1 – Charakteristické znaky nádorové buňky podle Hanahana a Weinberga.**  
upraveno podle (Hanahan 2011)

(ii) Signály potlačující růst blokují proliferaci dvěma hlavními mechanismy. Buňka může vstoupit do  $G_0$  klidové fáze nebo do postmitotické fáze (terminálně diferencovaná buňka). Většina nádorů má inaktivované proteiny pRb a p53, což vede k uvolnění faktorů, které umožňují vstup buňky do S fáze a inhibují diferenciaci. (Koutecký 2004 a Hanahan 2000)

(iii) K charakteristickým znakům nádorové buňky patří rezistence na apoptózu, programovanou buněčnou smrt. Morfologicky se apoptóza projevuje desintegrací buněčné membrány, fragmentací jádra a rozpadem chromosomů. Makrofágy a jiné

fagocyty pak tyto buňky rozpoznají a odstraní je procesem fagocytózy bez zánětlivé reakce. (Koolman 2005 a Koutecký 2004)

Vnější apoptotická dráha je spuštěna vazbou „death“ ligandů s „death“ receptory Fas (Fas/FasL signalizace) a TNFR (TNFR signalizace). Poté se spustí kaskáda dějů, která vrcholí aktivací efektorových kaspas. Ty štěpí řadu proteinů (např. lamin v jaderné membráně nebo enzymy štěpící DNA). K aktivaci apoptózy může dojít i na základě vnitřních podnětů. Při nadměrné produkci cytotoxických volných radikálů dojde k depolarizaci vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c, který se navazuje na protein Apaf-1, čímž dochází opět k aktivaci efektorových kaspas. (Koolman 2005 a Koutecký 2004)

Při nevratném poškození DNA se aktivují proteinkinasy ATM a ATR, sled dalších dějů aktivuje protein p53, produkt tumor supresorového genu, který po vazbě na DNA indukuje tvorbu bílkovin brzdících vstup do S fáze buněčného cyklu. (Klener 2010) Buňka tím získá čas k opravám DNA nebo spustí apoptózu. (Koolman 2005 a Koutecký 2004)

Mezi hlavní regulátory apoptózy patří proteiny rodiny BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) a IAP/BIRP (*inhibitors of apoptosis proteins/baculoviral IAP repeat containing protein*). (Klener 2010)

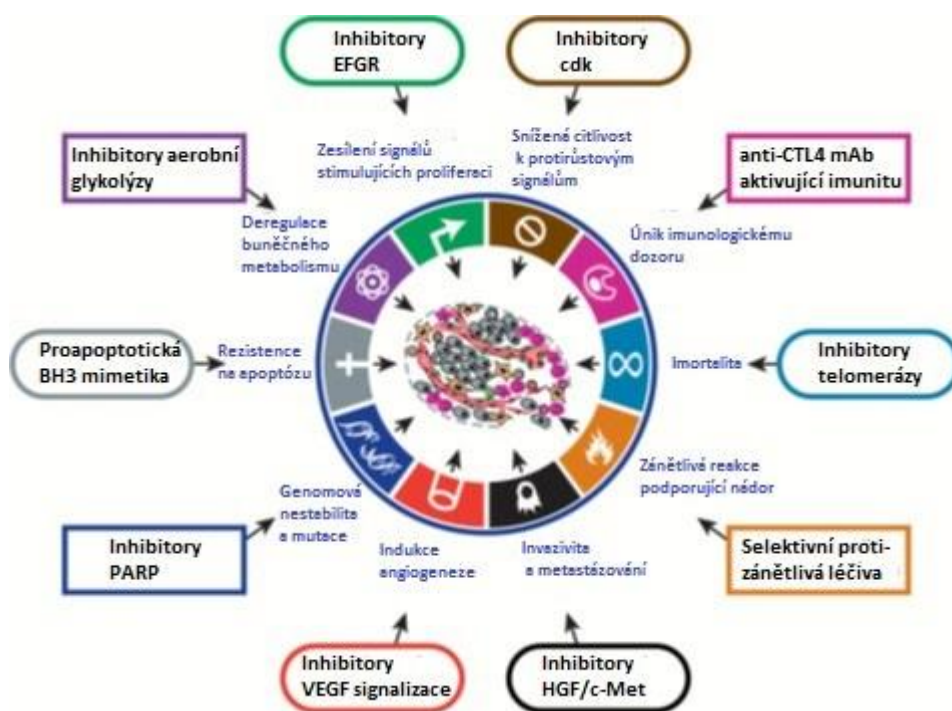
**(iv)** Stárnutí buněk je provázeno krácením telomer, koncových struktur chromosomů, které zajišťují jejich stabilitu. Při každé replikaci DNA dojde ke zkrácení telomer o 50 – 100 párů bází. Důvodem limitovaného počtu dělení normální buňky je ztráta těchto ochranných sekvencí. Kolem 85 – 90 % nádorových buněk má aktivní enzym telomerasu, což je reversní transkriptasa, která tvoří na koncích chromosomů specifické nukleotidové sekvence. (Hanahan 2000)

**(v)** Metastázování je termín, který označuje migraci nádoru do oblastí anatomicky vzdálených od primárního nádoru. Jedná se o vícestupňový proces, který nejlépe popisuje metastatická kaskáda: invaze-transport-extravazace-nidace a růst metastáz. Nádorová buňka musí nejprve proniknout skrze extracelulární matrix (ECM) a přes bazální membránu endotelu do lumen cévy. Toho dosahuje sníženou expresí membránového glykoproteinu E-kadherinu a zvýšenou aktivitou metaloproteas. Ztrátou kontaktu s ECM projde buňka významnou přeměnou z epitheliálního na mezenchymální fenotyp (EMT, *epithelial-to-mesenchymal transition*), který se vyznačuje ztrátou diferenciačních markerů

a zvýšenou expresí mezenchymálních markerů, vimentinu a fibronektinu. Nejsnadněji prostupují nádorové buňky do lymfatických kapilár, kde tvoří metastázy zejména v uzlinách. Tyto buňky pak mohou mírně vaskularizovat a umožnit snadnější prostup buněk do krevního řečiště. V systémové cirkulaci přežije méně než 0,1 % migrujících nádorových buněk. K eliminaci nádorových buněk v krevním řečišti přispívají mechanické faktory krevního proudění, „kyslíkový efekt“ (vysoká tenze kyslíku v arteriální krvi a plicních kapilárách) nebo oxid dusnatý (NO) uvolňovaný z aktivovaných makrofágů. NO ale na druhou stranu usnadňuje přichycení nádorových buněk k endotelu (působí vazodilatačně a potencuje agregaci trombocytů). K extravazaci a nidaci dochází nejčastěji v kapilární síti orgánů. V cílové tkáni pak metastáza roste. Díky vlivu nového prostředí se často liší od primárního nádoru. (Hanahan 2000, Koutecký 2004 a Klener 2010)

**(vi)** S procesem metastázování úzce souvisí tvorba nových cév (angiogeneze). Ke svému růstu potřebuje nádor plynulý přísun kyslíku, proto je pro něj tvorba nových cév limitujícím faktorem. Schopnost tvořit cévy je získanou vlastností nádoru v reakci na hypoxii. Cévy vytvořené *de novo* nádorovými buňkami jsou nevyzrálé, neuspořádané a chaotické, proto zde často dochází ke krvácení nebo trombózám. K angiogenezi dochází mnoha mechanismy, nejčastějším je pučení již vytvořených cév, které je popsáno angiogenní kaskádou. V klidové fázi je integrita cévy udržována vlivem angiopoetinu 1 (ANG1). V plastické fázi dochází k oslabení integrity mezi endotelovými buňkami vlivem zvýšeného poměru exprese ANG2/ANG1, céva je poté citlivější na angiogenní podněty a zároveň vylučuje do extravaskulárního prostoru fibrinogen a plazminogen. Síť fibrinových vláken vytváří matrici pro růst nové cévy. V aktivní angiogenní fázi se na povrchu cévy vytvářejí pupeny, které narůstají a zachycují se ve fibrinové síti. V poslední maturační fázi dochází k přechodu do klidové fáze. (Hanahan 2000 a Klener 2010)

Obrázek 2 na následující straně zároveň poskytuje pohled na nádorové mikroprostředí. Nenacházejí se zde jen buňky nádoru (redukcionistický pohled), ale také další buňky, se kterými je nádor v neustálé interakci (komplexní pohled). Patří mezi ně např. fibroblasty, makrofágy, dendritické buňky, lymfocyty, endoteliální buňky cév a pericyty (vnější vrstva podpurných buněk cév) a samozřejmě také ECM. (Hanahan 2000 a 2011, Klener 2010)



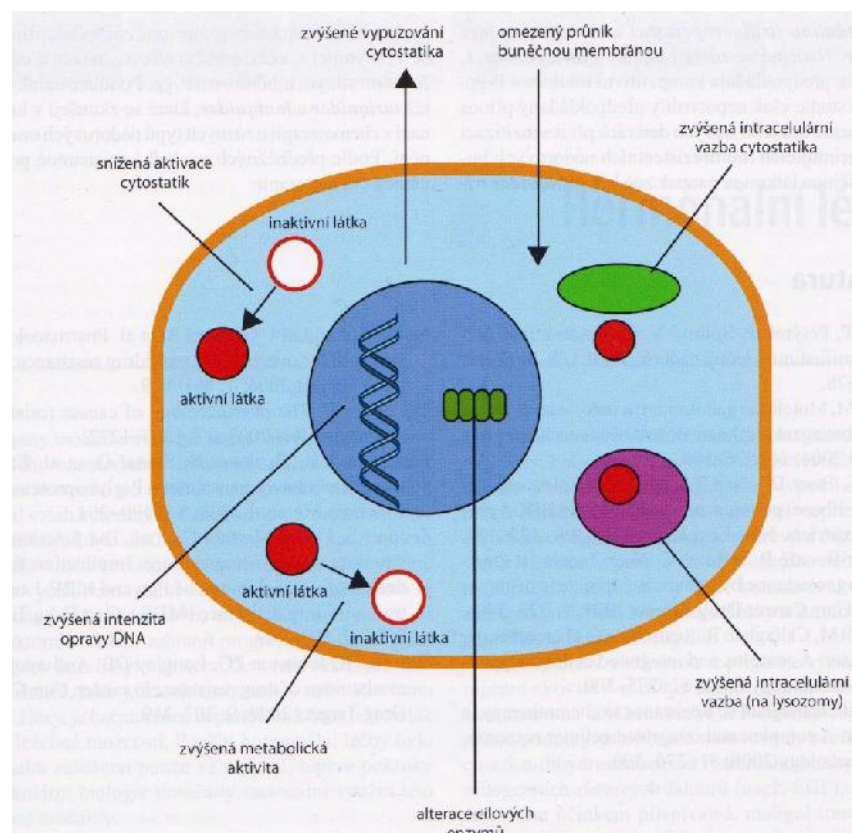
**Obrázek 2 – Charakteristiky nádorové buňky jako cíle protinádorové chemoterapie, uvedeny jsou ilustrativní příklady. upraveno podle (Hanahan 2011)**

Hanahan a Weinberg přišli v roce 2011 s rozšířením své práce o charakteristikách nádorové buňky. (obr. 2) (Hanahan 2011) Již zmíněných šest znaků doplnili „charakteristikami, které tyto změny umožňují“ (*enabling hallmarks*). První byla nazvána **(vii)** nestálostí genomu. Předpokladem pro fixaci a hromadění genetických změn je nedostatečná výkonnost reparačních mechanismů. Výrazem nestability genomu je pak heterogenita karyotypů v buněčných populacích jednotlivých nádorů a jednotlivých typů nádorů. Další charakteristikou je **(viii)** zánětlivá reakce podporující nádor. Pokud se v raných fázích neoplastické progresy vyskytují v okolí prozánětlivé imunitní buňky, mohou stimulovat maligní vývoj buněk např. uvolňováním bioaktivních molekul (růstové faktory, faktory podporující angiogenezi, invazivitu a metastázování) nebo cytotoxických volných radikálů, které jsou pro buňky mutagenní. Další rozšíření se týká „doplňujících charakteristik“ (*emerging hallmarks*), mezi které patří **(ix)** vymanění se imunologickému dozoru a **(x)** deregulace buněčného metabolismu. Bod **(x)** se týká tzv. Warburgova efektu, typického pro nádorové buňky. V hypoxických podmínkách je potlačena oxidativní fosforylace, ale glykolýza je naopak velmi aktivní. Glykolýzou buňka sice získá méně ATP, ale je to pro ni rychlejší zdroj energie. Buňka tedy zvýší expresi enzymů glykolýzy a GLUT1,

čímž získá nejen energii, ale i zdroj aminokyselin a nukleosidů, což je pro proliferující buňku výhodné. Produktem glykolýzy se stává laktát, který snižuje pH nádoru. U některých nádorů byla objevena spolupráce dvou subpopulací. Hypoxická subpopulace produkovala laktát a exportovala ho jako odpad, subpopulace lépe zásobená kyslíkem pak laktát dokázala využít. Tyto poznatky však zatím nejsou zcela všeobecné. (Hanahan 2011)

## 1.2. MECHANISMY REZISTENCE

Častým problémem protinádorové léčby je vznik rezistence. Mechanismy rezistence na léčiva bývají komplexní povahy. Jedná se (i) o změnu farmakokinetiky cytostatika (snížená resorpce, zvýšené vylučování) a (ii) o změnu cytogenetiky. S růstem nádoru přibývá buněk v  $G_0$  fázi buněčného cyklu, kdy je citlivost k chemoterapii omezená, dále vznikají spontánní sekundární mutace buněk. Dochází ke snížení koncentrace nebo aktivity enzymů biotransformujících xenobiotikum na účinnou látku nebo ke zvýšení koncentrace biodegradačních enzymů. Další příčinou může být zvýšená intracelulární sekvestrace např. do lysosomů nebo porucha mechanismů apoptózy. (obr. 3) (Klener 2010)



**Obrázek 3 – Schematické znázornění mechanismů rezistence, převzato z (Klener 2010)**

### 1.3. NEUROBLASTOM

Neuroblastom (NB) je maligní embryonální nádor periferního sympatického nervového systému odvozeného od neurální lišty a nejčastější nádor u dětí do jednoho roku života. Průměrný věk pacientů v době diagnózy je osmnáct měsíců, 40 % případů se vyskytuje do jednoho roku života, 75 % do čtyř let a 98 % do deseti let. *(Brodeur 2003)* Incidence se celosvětově pohybuje kolem 10 onemocnění na milion dětí. *(Heck 2009)* V České republice je neuroblastom diagnostikován každý rok u 25 – 30 dětí. *(Mazánek 2008)* Jedná se o velmi heterogenní nádorové onemocnění, může projít spontánní regresí u kojenců nebo maturovat v benigní ganglioneurom. Mnoho dětí starších jednoho roku života však má v čase diagnózy již velmi rozvinuté onemocnění s metastázami. NB se rozšiřuje do lymfatických uzlin, kostí a kostní dřeně. U kojenců v klinickém stádiu 4S také do jater a kůže, tyto děti však mají dobrou prognózu díky spontánní regresí. *(Brodeur 2003)* Velmi zajímavé je, že NB má nejvyšší míru spontánní regrese ze všech nádorů (5 – 10 % případů diagnózy NB). *(Heck 2009)*

**Neurální lišta**, nepravidelný embryonální útvar odvozený od neuroektodermu, se vytváří na konci třetího a začátku čtvrtého týdne embryogeneze. Při neurulaci ztrácí některé z neuroektodermálních buněk uložených na vrcholu neurálních valů kontinuitu s epitelem a oddělují se od nově vznikající nervové trubice. Buňky neurální lišty jsou původně pluripotentní, ale při migraci do specifických oblastí tuto vlastnost ztrácí. Diferenciují se převážně v buňky ganglií autonomního nervového systému a v buňky periferního nervového systému, jako jsou buňky kraniálních a spinálních ganglií, buňky obalů periferních nervů (Schwannovy buňky) a mozkomíšních plen. Přispívají také ke vzniku pigmentových buněk, elementů dřeně nadledvin a skeletálních a svalových komponent hlavy. *(Moore 2002 a Brodeur 2000)* Nejčastěji se NB vyskytuje v dřeni nadledvin (cca 40 % případů), v ostatních případech v paraspinálních gangliích sympatiku hrudníku, břicha a pánve. *(Goodman 2008 a Brodeur 2003)*

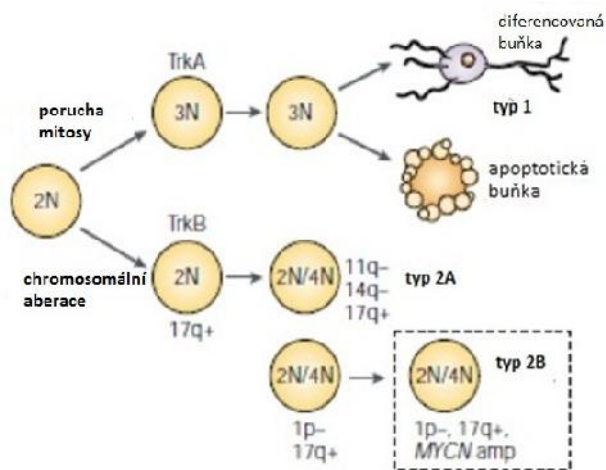
Mezi sérové markery NB patří sérový ferritin, neuronální specifická enolasa (NSE), disialogangliosid G<sub>D2</sub> a sérová laktátdehydrogenasa (LDH), žádný z těchto markerů se však v současnosti nevyužívá pro určení prognózy a terapie. Spíše se využívají genetické markery pro zjištění změn v genové expresi, karyotypu nebo v amplifikaci/deleci genetického materiálu (vyšetření FISH a CGH). *(Brodeur 2003 a Mazánek 2008)* Pomocí



hmotnostního skríninku lze detegovat v moči katecholaminy, které NB produkuje. Tato metoda však detekovala onemocnění spíše v asymptomatických případech u kojenců, kdy většinou docházelo ke spontánní regresi onemocnění, nebo postačila mírná léčba a ke snížení mortality nedocházelo. Výsledky vypovídaly o dvou typech NB, kdy první typ s příznivým vývojem se objevuje u kojenců, zatímco druhý typ s nepříznivým vývojem se objevuje u dětí starších. První typ jen velmi vzácně přechází v druhý. (Brodeur 2003) O těchto typech pojednává následující kapitola.

### 1.3.1. GENETICKÁ CHARAKTERIZACE NEUROBLASTOMŮ

Jsou popisovány dva genetické typy NB. (obr.4) První typ (**typ 1**) začíná poruchou mitózy, kdy vzniká hyperdiploidní nebo téměř triploidní (*near-triploid*) karyotyp bez cytogenetických přeskupování. Tyto buňky vysoce exprimují TrkA a jsou předurčeny buď k diferenciaci nebo k apoptóze, což závisí na přítomnosti či absenci NGF. Tento typ NB se vyskytuje u pacientů kojeneckého věku, kteří mají dobrou prognózu.



**Typ 2** je provázen mnoha chromosomálními aberacemi a jedná se o téměř diploidní (*near-diploid*) karyotyp. Pro tyto buňky je typická snížená exprese **TrkA**, zvýšená exprese **TrkB**,

**BDNF** a amplifikace dlouhého raménka chromosomu 17 (**17q**). **Obrázek 4 – Genetické typy neuroblastomu. upraveno podle (Brodeur 2003)**

V této skupině se dále rozlišují dva podtypy. Podtyp 2A je charakterizován delecí dlouhých ramének chromosomu 11 a 14 (**11q** a **14q**). Pacienti s tímto typem NB jsou většinou starší, dochází k pomalé progresi nádoru, ale je smrtelný. Podtyp 2B se vyznačuje amplifikací **MYCN** obvykle spojenou s delecí krátkého raménka chromosomu 1 (**1p**) a postihuje pacienty ve věku od jednoho do pěti let života, onemocnění je vysoce progresivní. (Brodeur 2003)

**MYCN** je protoonkogen exprimovaný převážně v buňkách nervové soustavy, který může při zvýšené expresi dovést buňku k neregulovanému růstu a proliferaci. Gen *MYCN* se nachází na krátkém raménku p24 chromosomu 2. Při procesu amplifikace je genetický materiál z 2p24 transponován na DMs (double minutes chromatin bodies), což jsou extrachromosomální elementy vzniklé nerovnoměrnou segregací během mitózy. Tyto DMs pak mohou být integrovány do náhodného chromosomu jako HSRs (homogeneously staining regions). Výsledkem amplifikace je obvykle 50 – 400 kopií genu *MYCN*. Pokud se na jednu haploidní buňku vyskytuje více jak 10 kopií, jedná se o důležitý prognostický faktor nepříznivého vývoje NB. (Maris 1999 a Brodeur 2003) Produkt tohoto genu je jaderný fosfoprotein, který obsahuje N-terminální transkripční doménu (Myc box) a C-terminální oblast obsahující bHLH-LZ motiv. *MYCN* vytváří heterodimer s jaderným proteinem *MAX*, který je stále exprimován. V  $G_0$  fázi buněčného cyklu vytváří homodimer *MAX/MAX*, který působí jako represor transkripce. Pokud je exprese *MYCN* vysoká, dochází k tvorbě heterodimerů *MYCN/MAX*, které interagují s E boxem promotoru cílových genů podporujících růst buňky, čímž dojde k jejich transkripční aktivaci. *MAD* a *MXI1* jsou kompetitivními inhibitory heterodimeru *MYCN/MAX*. U některých neuroblastomů byla nalezena vysoká exprese *MYCN* bez amplifikace, což je vysvětlováno jako selhání cesty proteinové degradace. Koamplifikace byla prokázána ve 40 – 50 % případech u genu pro RNA helikasu *DDX1*. (Maris 1999 a Brodeur 2003)

Delece krátkého raménka chromosomu 1 je pozorována v 19 – 36 % primárních neuroblastomů. Kritická oblast 1p36.2 – 1p36.3, která bývá nejčastěji deletována, obsahuje „tumor supresorové“ geny NB, transkripční faktor *HKR3* a člen TNFR rodiny *DR3*. Byla nalezena silná korelace mezi amplifikací *MYCN* a **delecí 1p** (70 % nádorů s *MYCN* amplifikací má i delecí 1p). (Davidoff 2012 a Maris 1999)

Nejčastěji deletovaná oblast primárního nádoru je dlouhé raménko chromosomu 11 (**11q**), která se objevuje u jedné třetiny všech neuroblastomů. U pacientů s NB bez *MYCN* amplifikace je delece 11q nepříznivým prognostickým faktorem. Alelická ztráta 11q je asociována s delecí dlouhého raménka chromosomu 14 (**14q**), která je přítomná ve všech rizikových skupinách NB. Může se tedy jednat o abnormalitu vznikající v raném vývoji nádoru. Delece 11q a 14q inverzně korelují s delecí 1p a amplifikací *MYCN*. (Maris 1999) Ve více než polovině neuroblastomů je pozorována **trisomie** dlouhého raménka

chromosomu 17 (**17q**). Zvýšená exprese IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) survivinu, jehož gen je lokalizovaný na dlouhém raménku chromosomu 17, je negativním prognostickým faktorem NB. Dalším kritickým genem může být *PPM1D*. (Brodeur 2003 a Davidoff 2012)

Velmi významná pro maligní transformaci neuroblastů sympatického nervového systému je neutrofinní signalizace. Mezi neutrofinní receptory patří TrkA (ligand NGF), TrkB (ligandy BDNF a neutrofin 4) a TrkC (ligand neutrofin 3). **TrkA** je transmembránový receptor, který pravděpodobně funguje jako homodimer. Po navázání NGF dojde k autofosforylaci receptoru, signální transdukci a indukci genové transkripce. Signální cesty vedou k přežití buňky nebo její diferenciaci. Při inhibici TrkA může dojít k apoptóze. Vysoká exprese TrkA vede u NB k příznivé prognóze a to dokonce i při *MYCN* amplifikaci. Aktivace receptoru pomocí NGF vede k diferenciaci neuroblastu na gangliové buňky. Vybrané neuroblasty indukují proliferaci Schwannových buněk, ty pak aktivují neurotrofické faktory, které vedou k diferenciaci neuroblastů. (Ambros 1996) **Spontánní regrese** nemoci u kojenců může být způsobena zpožděnou vývojovou apoptózou u pacientů s NB exprimujícím TrkA v důsledku nepřítomnosti NGF. (Brodeur 2003)

**TrkB a TrkC** jsou exprimovány ve zkrácené formě bez tyrozinkinasy a v plné formě, která je asociována s nádory s *MYCN* amplifikací. Tyto nádory také exprimují ligand receptoru TrkB BDNF, čímž dochází k TrkB/BDNF autokrinní nebo parakrinní regulaci podporující růst buňky. Tato cesta také podporuje angiogenezi a rezistenci na léčiva. TrkC je exprimován v nádorech bez *MYCN* amplifikace.

Transmembránový receptor **p75** je člen rodiny TNFR a váže NGF rodinu s nízkou afinitou. Všeobecně je však p75 spojován s dobrou prognózou. (Brodeur 2003)

Absence NGF je ve vyvíjejícím se nervovém systému hlavním signálem pro **apoptózu**, dochází tak k odstranění přebytečných buněk. Členové TNFR rodiny jako např. p75 (s nízkou afinitou váže NGF) a CD95/Fas (váže FasL) a také receptory pro retinovou kyselinu mohou iniciovat apoptózu. Intracelulární molekuly zprostředkovávající apoptózu jsou členové BCL2 rodiny. Inhibitory apoptózy jako Bcl-2 nebo Bcl-X<sub>L</sub> jsou vysoce exprimovány v rané ontogenezi a také v NB. Členové této rodiny mohou být příčinou rezistence na léčiva. Vysoká exprese kaspas naopak apoptózu podporuje. Se zvýšeným **efluxem léčiv a rezistencí** je také spojován MDR1 a MRP z rodiny ABC transportérů.

**Telomeras** je reversní transkriptasa důležitá pro udržení délky telomer, struktur na koncích chromosomů. U nádorových buněk je aktivita telomerasy zvýšena. (u NB 96 % případů).

Gen *NME* kóduje **nukleosiddifosfátkinasu A**, inhibitor metastázování. Snížená exprese v nádorech značí zvýšenou pravděpodobnost metastázování. V NB (klinická stádia 3 a 4) však byla nalezena zvýšená exprese tohoto genu, která je zde negativním prognostickým faktorem. Gen *MMP9* kóduje metaloproteinasu **gelatinasu B**, která je důležitá pro lokální invazi a metastázování. Zvýšená exprese tohoto genu se objevuje primárně u stromálních buněk obklopujících nádor. (Maris 1999)

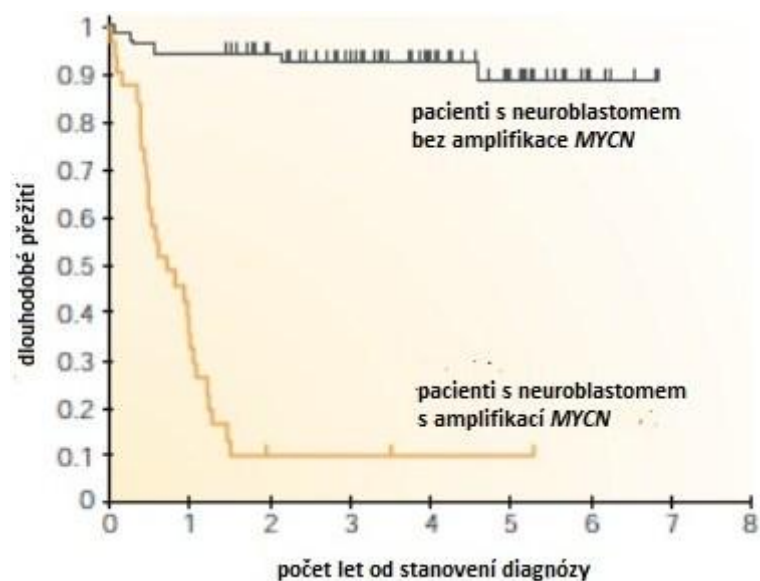
### 1.3.2. KLINICKÁ STÁDIA NEUROBLASTOMU A SOUČASNÁ CHEMOTERAPIE

**Prognózu** onemocnění u pacientů s NB určuje stádium nemoci definované **INSS** (*International Neuroblastoma Staging System*), dále věk pacienta v čase diagnózy a místo primárního nádoru. Pro klinické stádium **1, 2, a 4S** platí dobrá prognóza (dlouhodobé přežití 90 %), u stadia **3 a 4** střední prognóza (dlouhodobé přežití 40 %). U kojenců je prognóza vždy lepší než u starších dětí při stejném klinickém stádiu nemoci. Nejhorší prognózu, co se týče místa primárního nádoru, mají pacienti s lokalizací v nadledvinách. (Broudeur 2003 a Koutecký 2004) Tyto poznatky o dějích v NB na molekulární úrovni (zároveň s INSS klasifikací, věkem pacienta a histopatologií) přispěly k zařazení pacientů do rizikových skupin, na jejichž základě je pak volena terapie. U pacientů **nízkého rizika** (*low risk neuroblastoma*) postačuje operace, mírná chemoterapie nebo vyčkání spontánní regrese onemocnění, zvláště u kojenců. Pacienti **středního rizika** (*intermediate risk neuroblastoma*) jsou dobře léčitelní chemoterapií. U NB **vysokého rizika** (*high risk neuroblastoma*), který se vyskytuje ve 40 % případů, však chemoterapie často selhává. Pokud dojde k amplifikaci onkogenu *MYCN* a delecí krátkého raménka chromosomu 1, je prognóza vždy špatná bez ohledu na klinické stádium a dlouhodobé přežití je menší než 25 %. (obr. 5 na následující straně)

**Současná chemoterapie** je založena na indukčních režimech kombinujících inhibitory topoisomerasy I (topotekan, irinotekan), topoisomerasy II (etoposid), antracyklinové antibiotikum doxorubicin, alkylační činidlo cyklofosamid, cisplatinu a inhibitor polymerace mikrotubulů vinca alkaloid vinkristin. (Mazánek 2008, Brodeur 2000)

Velkým problémem je toxicita mnohých léčiv jako např. kardiotoxicita doxorubicinu, urotoxicita a pneumotoxicita cyklofosfamidu, nefrotoxicita cisplatinu nebo neurotoxicita vinkristinu. (Koutecký 2004) Proto se výzkum zaměřuje na studium nových směrů chemoterapie NB: inhibice ALK receptorové tyrosinkinasy (ALK přispívá k malignímu fenotypu neuroblastomu), inhibice aurora A kinasy (vysoce exprimována v dělící se buňce), příprava agonistů TrkA a inhibitorů TrkB, inhibice polymerace mikrotubulů, DNA methylace, modifikace histonů a zásahy do metabolismu miRNA. (Davidoff 2012)

Velmi nadějným potencionálním kancerostatikem se zdá být alkylační (arylační) činidlo ellipticin.



**Obrázek 5 – Křivky závislosti dlouhodobého přežití na čase od diagnózy u kojenců.**  
upraveno podle (Brodeur 2003)

## 1.4. ELLIPTICIN

Alkaloid ellipticin ( $C_{17}H_{14}N_2$ , 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol), poprvé izolovaný v roce 1959 z rostlin čeledi *Apocyanaceae* (Goodwin 1959), je potenciální protinádorové léčivo, jehož výhodou je vysoká účinnost a nízká vedlejší toxicita. Dalším kladem je, že nezpůsobuje hematologické komplikace. (Auclair 1987) Mechanismus protinádorového účinku ellipticinu je založen na jeho interkalaci do struktury dvojšroubovice DNA, inhibici DNA topoisomerasy II (Froelich-Ammon 1995) a na kovalentní modifikaci DNA po enzymové aktivaci cytochromy P450 a peroxidasami, sulfotransferasami a N,O-acetyltransferasami. Dochází tak k tvorbě deoxyguanosinových aduktů. (Stiborová 2001, 2004a, 2006 a 2012)

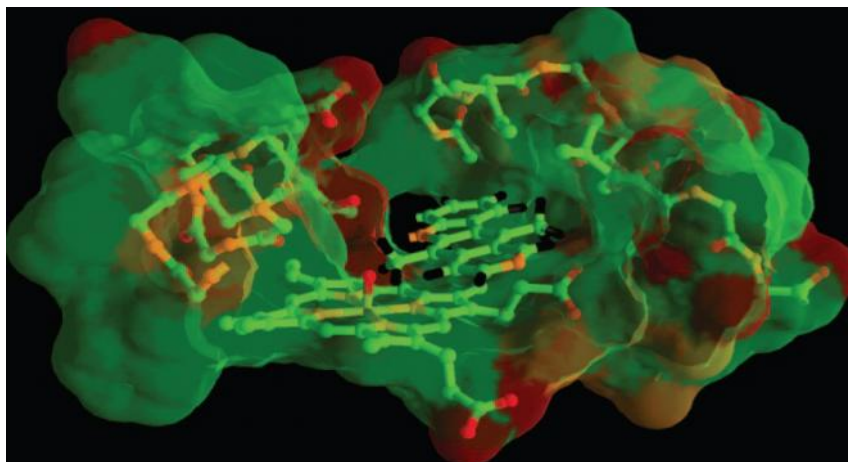
### 1.4.1. MECHANISMUS CYTOTOXICITY ELLIPTICINU

Ellipticin je v jaterních mikrosomech přeměňován na metabolity. Patří mezi ně **7- a 9-hydroxyellipticin**, které byly identifikovány jako detoxifikační produkty, které organismus vylučuje. Další produkty **12-, 13-hydroxyellipticin a N(2)-oxid ellipticinu** jsou cytotoxické. Vznikají z nich karbeniové ionty ellipticin-12-ylum a ellipticin-13-ylum. N(2)-oxid ellipticinu je neenzymaticky přeměňován přesmykem Polonowského na 13-hydroxyellipticin. Reaktivní karbeniové ionty se kovalentně váží na jedno z nukleofilních míst v DNA, na aminoskupinu deoxyguanosinu. Majoritní **adukt 1** vzniká z 13-hydroxyellipticinu, majoritní **adukt 2** z 12-hydroxyellipticinu. (Stiborová 2001, 2004a, 2011)

Ellipticin je enzymaticky metabolisován cytochromy P450 (CYP), peroxidasami cyklooxygenasami (COX-1, COX-2), laktoperoxidasou (LPO) a myeloperoxidasou (MPO), sulfotransferasami (SULT1A1/2/3, SULT2A1) a N,O-acetyltransferasami (NAT1/2). (Stiborová 2001, 2004a, 2006, 2012)

**Cytochromy P450**, hemthiolátové enzymy, jsou součástí systému oxidas se smíšenou funkcí (MFO) v ER. Tvorbu metabolitů ellipticinu zajišťují různé isoformy cytochromů P450. CYP1A1, 1A2 a 1B1 oxidují ellipticin převážně na 7- a 9-hydroxyellipticin, detoxifikační produkty. CYP3A4 (v menší míře CYP1A2, 2D6 a 2C9) metabolisuje ellipticin na 13-hydroxyellipticin a N(2)-oxid ellipticinu. (obr. 6 na následující straně) 12-hydroxyellipticin vzniká enzymatickou oxidací CYP3A4 a 2C9. V systému MFO se nachází ještě NADPH:cytochrom P450 reduktasa, která vytváří aktivní komplex s CYP. (Stiborová

2004 a 2011) Fakultativně se v systému MFO objevuje cytochrom b<sub>5</sub>, který moduluje účinnost CYP3A4 (Schenkman 2003) a specifitu hydroxylace ellipticinu enzymy CYP3A4 (Stiborová 2012) a CYP1A1/2 ve prospěch aktivačních metabolitů. (Kotrbová 2011)



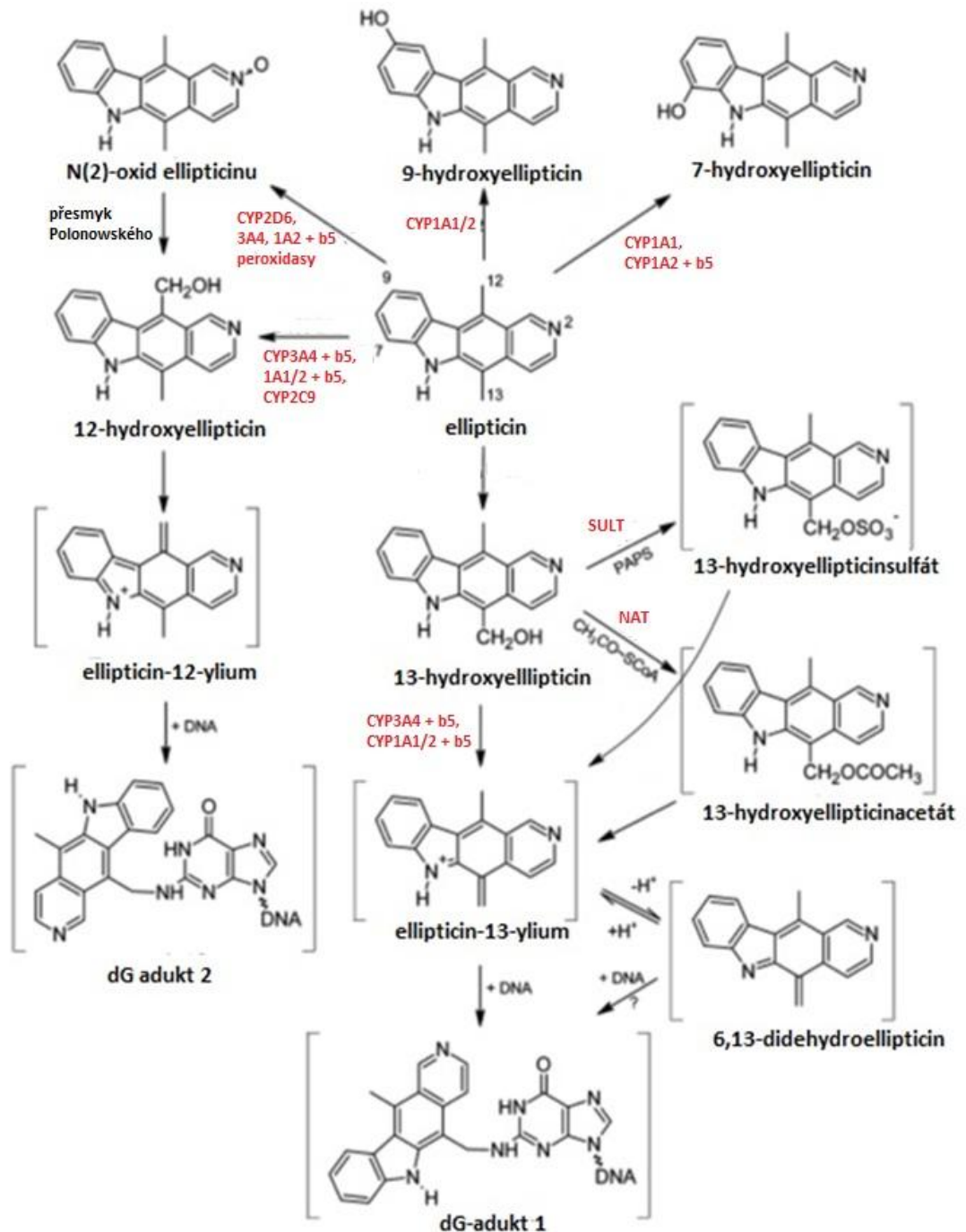
**Obrázek 6 – Ellipticin v aktivním místě hemthiolátového enzymu CYP3A4. Methyl uhlíku C13 ellipticinu je v blízkosti oxoferryly, vzniká tak metabolit 13-hydroxyellipticin. převzato z (Stiborová 2004)**

Hlavním produktem přeměny ellipticinu pomocí **peroxidas** je dimer ellipticinu spojený přes N<sup>6</sup> pyrrolového kruhu a uhlík C9 druhé molekuly ellipticinu. V přítomnosti DNA klesá množství dimeru ellipticinu, což koreluje se zvyšujícím se počtem DNA aduktů. Za tvorbu aduktu 1 je pravděpodobně zodpovědná dvouelektronová oxidace ellipticinu peroxidasami na ellipticin methylen-imin, který tvoří shodný adukt jako ellipticin-13-ylium. Minoritním produktem oxidace ellipticinu peroxidasami je N(2)-oxid ellipticinu, ze kterého vzniká adukt 2. Peroxidasy dále přispívají ke tvorbě aduktů 6 a 7. (Stiborová 2006)

V přítomnosti **sulfotransferas**, **N,O-acetyltransferas** a jejich kofaktorů (PAPS, acetylCoA) se zvyšuje množství aduktů tvořených 13-hydroxyellipticinem. Jen některé sulfotransferasy podporují vznik DNA aduktů, nejvíce SULT1A3 – 69x. N,O-acetyltransferasy NAT1 a NAT2 zvyšují počet aduktů 33x resp. 188x. Nejpravděpodobnější mechanismus vzniku 13-hydroxyellipticinu je následující. Po sulfátové nebo acetátové konjugaci ellipticinu pomocí zmíněných enzymů a kofaktorů dojde ke kyselé hydrolyze. Oxoniový ion narušuje vazbu mezi uhlíkem C13 a kyslíkem sulfátového nebo acetátového esteru. V malém množství vzniká také 6,13-didehydroellipticin. (Stiborová 2012) Metabolismus ellipticinu je znázorněn na obrázku 7 na následující straně.

Adukty byly potvrzeny *in vitro* v nádorových buněčných kulturách prsního adenokarcinomu (MCF-7), leukemie (HL-60, CCRF-CEM), glioblastomu (U87MG) a

neuroblastomu (IMR-32, UKF-NB-3, UKF-NB-4). (Stiborová 2011) *In vivo* byly adukty nalezeny v buňkách prsního adenokarcinomu potkanů a také ve zdravých tkáních, kde však nepřetrvávaly. (Stiborová 2007) Ellipticin je díky těmto poznatkům nadějným potencionálním protinádorovým léčivem.



Obrázek 7 – Schéma metabolismu ellipticinu. upraveno podle (Stiborová 2012)

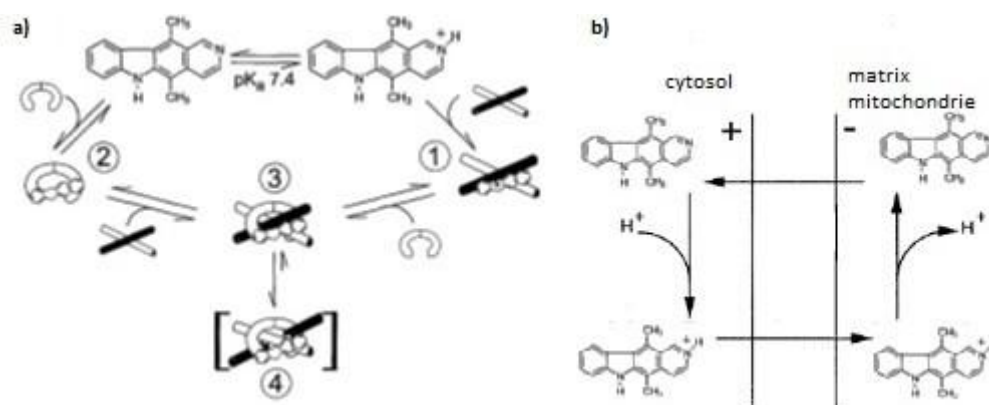


## 1.4.2. MECHANISMUS APOPTÓZY INDUKOVANÉ ELLIPTICINEM

Alkaloid ellipticin, potencionální protinádorové léčivo, zastavuje buněčný cyklus a indukuje apoptózu vznikem cytotoxických volných radikálů, zvýšením mitogen-aktivovaných proteinkinás ERK a JNK, aktivuje Fas/FasL systém, indukuje aktivaci efektorových kaspas a štěpení poly(ADP-ribose)polymerasy 1 (PARP1), (Kuo 2005 a 2006, Kim 2011), snižuje expresi antiapoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-X<sub>L</sub> (Kuo 2005) a zvyšuje expresi proapoptotických proteinů Bak, Bax a Bcl-X<sub>S</sub>. (Kuo 2006) Ellipticin a jeho reaktivnější forma 9-hydroxyellipticin selektivně inhibuje fosforylaci p53. (Ohashi 1995)

Ellipticin také spouští **vnitřní apoptotickou dráhu**, (Kuo 2005 a 2006, Kim 2011), způsobuje depolarizaci mitochondrií a odpřáhne oxidativní fosforylaci. (Schwaller 1995) Jako lipofilní molekula volně prostupuje membránami a díky svému  $pK_a = 7,4$  může být (de)protonizován za fyziologického pH v závislosti na tom, jestli se nachází v cytosolu nebo v mitochondriích. (Schwaller 1995) (obr. 8b)

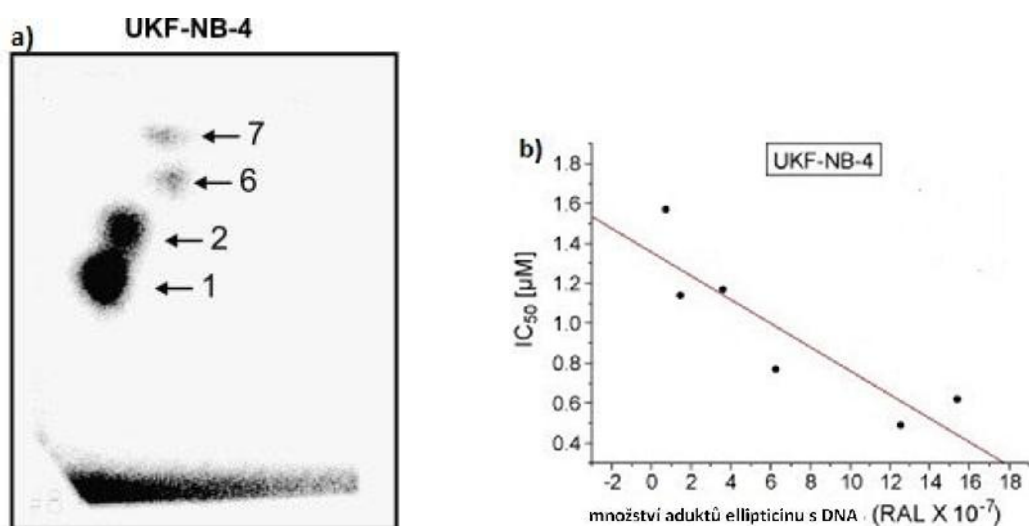
**Topoisomerasa II (TOP2)** je enzym, který katalyzuje štěpení a následné spojení dvojlátkové DNA, což umožňuje měnit topologii DNA a tlumit torzní napětí během transkripce a replikace. (Froelich-Ammon 1995) Ellipticin tvoří stabilní komplex s TOP2 a posouvá tím aktivitu enzymu ve prospěch štěpných produktů. (obr. 8a) Ellipticin může také interkalovat do struktury DNA (Froelich-Ammon 1995) a tvořit po enzymové aktivaci DNA adukty s guanosinem. (Stiborová 2001) Výsledkem je poškození DNA, které indukuje apoptózu v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4. (Poljaková 2009)



**Obrázek 8 – a) Ellipticin jako inhibitor topoisomerasy II (TOP2), 1 - v protonované formě interaguje s DNA, 2 - v neutrální interaguje s TOP2, 3 - ternární komplex TOP2 DNA ellipticin, 4 - poškození DNA .  
b) Ellipticin jako ionoforní molekula přenášející protony.  
upraveno podle (Froelich-Ammon 1995 a Schwaller 1995)**

### 1.4.3 CYTOTOXICITA ELLIPTICINU VŮČI NEUROBLASTOMOVÝM BUNĚČNÝM LINIÍM

Neuroblastomové buněčné linie jsou velmi senzitivní k ellipticinu, což dokazují hodnoty  $IC_{50}$  pro linii IMR-32 0,27  $\mu\text{M}$ , UKF-NB-3 0,44  $\mu\text{M}$  a pro UKF-NB-4 0,49  $\mu\text{M}$ . U linií IMR-32 a UKF-NB-4 koresponduje cytotoxicita s množstvím deoxyguanosinových aduktů. (Obr. 9b) U všech tří NB buněčných linií vznikají majoritní adukty 1 a 2. (Obr. 9a) Při expozici 10  $\mu\text{M}$  ellipticinu navíc vznikají v DNA izolované z linie UKF-NB-4 minoritní adukty 6 a 7 vzniklé především katalytickou oxidací peroxidasami. Zároveň bylo zjištěno, že snížení množství aduktů v liniích IMR-32 a UKF-NB-4 za hypoxických podmínek (prostředí typické pro maligní nádory) odpovídá snížené cytotoxicitě ellipticinu a zpomalení růstu nádoru. Ellipticin inhibuje buněčný cyklus na rozhraní  $G_1/S$  fáze a dochází k akumulaci buněk UKF-NB-4 v S fázi. Pravděpodobným mechanismem cytotoxicity je neschopnost komplexu DNA polymerasy replikovat přes ellipticinem indukované adukty s DNA. Dále ellipticin spouští v UKF-NB-4 apoptózu, což bylo prokázáno vznikem DNA fragmentů (Stiborová 2011 a Poljaková 2009)

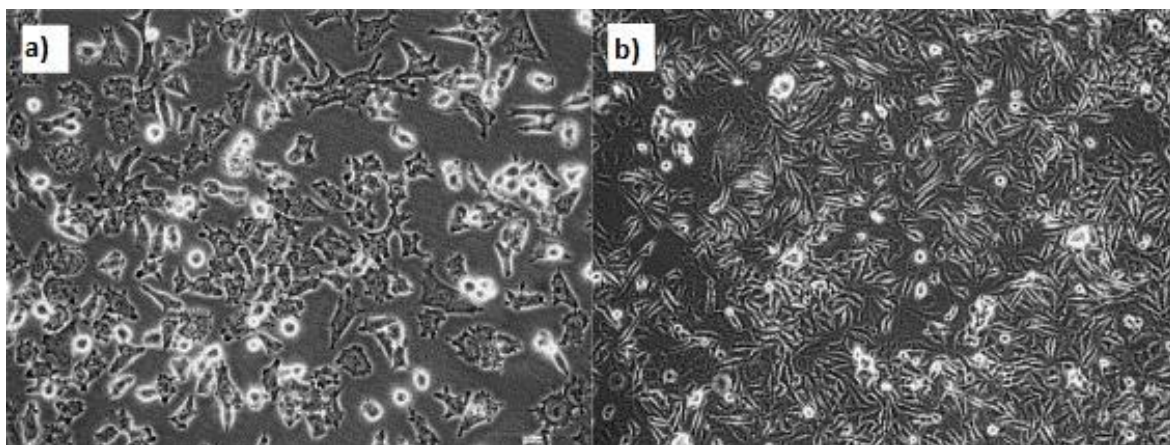


Obrázek 9 – a) Autoradiografie DNA aduktů tvořených aktivovaným ellipticinem v DNA izolované z neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 detekovaných metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“. b) Korelace  $IC_{50}$  s počtem DNA aduktů v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4. Množství aduktů s DNA je vztaženo na  $10^7$  nukleotidů. upraveno podle (Poljaková 2009)

#### 1.4.4. NEUROBLASTOMOVÁ LINIE UKF-NB-4 REZISTENTNÍ NA ELLIPTICIN

UKF-NB-4 buněčná linie byla založena z rekurentních metastáz kostní dřeně NB **buněčné linie vysokého rizika** (*high risk neuroblastoma*) s MYCN amplifikací, delecí 1p a aneuploidií. (Procházka 2012) Amplifikace MYCN je spojena s nepříznivým vývojem onemocnění. (Brodeur 2003) Základní vlastností této linie je **rezistence** na léčiva. Neuroblastomová buněčná linie rezistentní na ellipticin vznikla inkubací po dobu 36 měsíců za zvyšující se koncentrace ellipticinu (0,2 – 2,5  $\mu$ M). Buňky jsou vřeténkovitě protáhlé s fenotypem podobným fibroblastům, mají snížený poměr cytoplazmy ku jádru a dochází k tvorbě neuritů. (obr. 10) Rezistentní linie roste pomaleji a vykazuje nižší množství DNA aduktů oproti parentální linii UKF-NB-4 při vystavení ellipticinu o stejné koncentraci. (Procházka 2012)

**Rezistence buněčné linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> na ellipticin** je způsobena souborem mnoha mechanismů. Zvýšenou expresí antiapoptotického Bcl-2, efluxem nebo degradací ellipticinu, sníženou expresí topoisomeras, zvýšenou expresí enzymů oxidativní fosforylace a buněčné respirace, vakuolární ATPasy, aerobní respirace a/nebo spermin syntetasy a pomalejším růstem buněk. (Procházka 2012)



**Obrázek 10 – Fotografie lidských neuroblastomových linií a) parentální UKF-NB-4, b) dceřiná UKF-NB-4 rezistentní na ellipticin (zvětšeno 200x). upraveno podle (Poljaková 2009)**

#### 1.5. EXPRESNÍ PROFILOVÁNÍ TECHNIKOU „DNA MICROARRAY“

Expresní profilování je proces získávání informací o expresi genů. Může být založené na sekvenování (cDNA knihovny, SAGE) nebo na hybridizaci. (Lee 2004)

„DNA microarray“ je metoda založená na hybridizaci cílové sekvence (z angl. *target*) se specifickými sondami (z angl. *probe*) s určitou nukleotidovou sekvencí na pevném

povrchu a umožňuje studovat expresi mnoha tisíců genů nebo dokonce celý genom v různých stádiích života organismu, tkáně nebo buňky. Získaná data se nazývají transkripčním/expresním profilem. (Lee 2004) Využívají se pro odhalení mechanismu účinku léčiv, diagnostiku nemocí, identifikaci nových genů a ke komplexnímu porozumění biologickým systémům. (Li 2002)

Sondy lze na pevný povrch nanést „spotováním“ nebo *in situ* syntézou. Při prvním způsobu jsou již připravené sondy roboticky „spotovány“ a imobilizovány na nylonové membráně nebo speciálně upraveném mikroskopickém sklíčku. Rozlišují se dva druhy sond. Pro cDNA microarray se využívají cDNA knihovny, což jsou sbírky plazmidových vektorů s vloženými mRNA segmenty přepsanými do cDNA. Ta je amplifikována pro experiment pomocí PCR se specifickými primery. Výhodou této metody je, že není třeba znát cílovou sekvenci. Dalším typem sondy je syntetický oligonukleotid. Genové sekvence jsou vybírány z veřejných databází, většinou se volí 30-70 mery. Pro *in situ* syntézu se využívají oligonukleotidy (zpravidla 25 mery), jejichž syntéza probíhá teprve na povrchu. (Lee 2004)

Firma Affymetrix začala jako první využívat *in situ* syntézy DNA v kombinaci s fotolitografickou technikou. Sklíčko nebo čip jsou nejprve modifikovány silanem, který obsahuje hydroxyalkylové skupiny rozšířené linkerem se speciální fotolabilní sondou. V okamžiku expozice světla přes fotolitografickou masku na povrch sklíčka nebo čipu na určitá místa je fotolabilní sonda odstraněna a na hydroxyalkylovou skupinu se naváže monomer nukleosid fosforamidit chráněný fotolabilním 5'-(O-methyl-6-nitropiperonyloxykarbonylem. Takto se postupuje dále připojením dalších monomerů na určitá místa. (Heller 2002)

Příprava vzorků pro hybridizaci se sondou probíhá nejčastěji podle protokolu amplifikace RNA. Proces začíná reversní transkripcí RNA s oligo(dT) primerem nesoucí T7 promotor. ArrayScript reversní transkriptasa (RT) katalyzuje syntézu prvního cDNA vlákna. Jednovláknová cDNA pak projde syntézou druhého vlákna. Následuje purifikace cDNA, kdy se odstraní RNA (pomocí RNasy H), primery, enzymy a soli, které by mohly inhibovat další proces *in vitro* transkripce (IVT) s T7 RNA polymerasou, jejíž výsledkem je produkce stovek až tisíců antisenseRNA (aRNA) ve vzorku. (Ambion Inc. 2002)

Pokud by se amplifikovala cDNA pomocí PCR, mohlo by vzniknout zkreslení oproti reálným úrovním exprese. (Lee 2004) IVT je konfigurována tak, aby začleňovala upravené nukleotidy aaUTP do aRNA, které obsahují reaktivní primární aminoskupinu na C5 pozici uracilu. Po purifikaci aRNA, kdy se odstraní neinkorporované nukleotidtrifosfáty, soli, enzymy a anorganické fosfáty, aby se zlepšila stabilita aRNA, následuje konjugace aRNA s barvivem. Nejvíce se používají estery N-hydroxysukcinylu označované za NHS esterová barviva (např. Cy<sup>TM</sup>3 nebo Cy5). Poslední purifikace zahrnuje odstranění volného barviva a výměnu pufru za beznukleosovou vodu. (Ambion Inc. 2002) Čistota vzorku je kontrolována spektrofotometricky. Měří se koncentrace fluorescenčního barviva pomocí jeho absorbance a poměr absorbancí při 260 a 280 nm, u RNA by tento poměr měl být v blízkosti 2,0. (Thermo Fisher Scientific Inc. 2008) Purifikovaná a označená aRNA je pak vhodná pro většinu komerčně dostupných microarray systémů, kde probíhá hybridizace vzorku se specifickými sondami. (Ambion Inc. 2002)

Hybridizace probíhá po určitý čas při určité teplotě ve tmě na „microarray platformě“. Teplota by měla být nižší než  $T_m$  sond, ale ne o tolik, aby se zredukovaly nespecifické hybridizace. Tomu se zabraňuje přidáním DNA s repetitivními sekvencemi. Ke každému spotu také náleží sonda MM (*mismatch*), která na rozdíl od původní sondy PM (*perfect match*) má přesně uprostřed jinou bázi, čímž se kontroluje křížová hybridizace. Pro odstranění nespecificky vázaných sekvencí se využívá promývání pufru o různé iontové síle. Vysušená platforma je pak připravena ke skenování. (Lee 2004)

Vazba vzorku se sondou se detekuje pomocí optických metod. Skenery mají konfokální lasery a pro každý „spot“ měří relativní množství fluorescence každého barviva. Obrazová analýza sestává ze tří procesů, lokalizace „spotu“, klasifikace popředí a pozadí a převod na numerická data. (Lee 2004) Porovnává se poměr červeného (zvýšená exprese) a zeleného (snížená exprese) signálu pro každý gen. (Heller 2002) Výsledkem je pak FC (*fold change*) transkriptu udávající poměr exprese určitého genu v jednotlivých vzorcích. Data pak mají dvě základní vlastnosti. Biologickou signifikanci, tedy jak moc je exprese genu ovlivněna podmínkami výzkumu, a statistickou signifikanci, tedy jak moc je důvěryhodná biologická signifikance. (Lee 2004)

## 2. CÍL PRÁCE

V současné době se léčba nádorových onemocnění na základě diagnostiky stává čím dál tím více individuální a díky tomu úspěšnější. Avšak největší komplikací protinádorové léčby je vznik rezistence, kdy se v průběhu léčby selektuje kmen, ve kterém určité cytostatikum ztrácí svou účinnost, nebo je jeho účinnost potlačena. Ke zlepšení úspěšnosti léčby je proto velmi důležité znát mechanismy rezistence na určitá cytostatika. V současné klinické praxi se využívá léčebných protokolů kombinujících více kancerostatik, proto je také důležité znát zkřížené rezistence mezi léčivy.

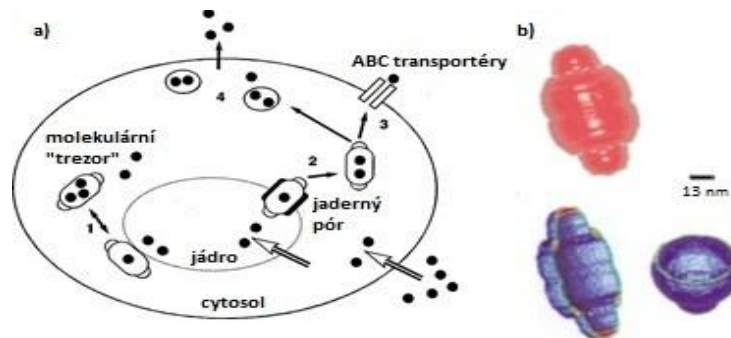
Cílem této bakalářské práce je shrnout možné mechanismy rezistence k ellipticinu v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> na základě pozměněného genetického a expresního profilu parentální buněčné linie UKF-NB-4 pomocí technik komparativní genomové hybridizace a „DNA microarray“. Budou vybrány především geny účastníci se metabolismu ellipticinu, účastníci se významných signálních drah a také geny, jejichž funkce v neuroblastomu již byla popsána v dostupných publikacích.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Lidská neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-4 byla dlouhodobě vystavena ellipticinu a postupně byla navozena rezistence na ellipticin (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>). Data změn genové exprese mezi rezistentní a parentální linií byla poskytnuta prof. MUDr. Tomášem Eckschlagerem, CSc. z Kliniky dětské hematologie a onkologie v pražském Motole. Analýzu „DNA microarray“ provedli PharmDr. Antonín Libra, Ph.D. a RNDr. Martin Bunček, Ph.D. z Generi Biotech s.r.o.

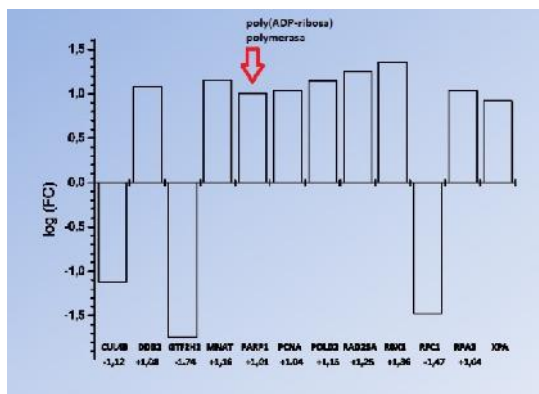
Velmi častou změnou v rezistentních buňkách bývá vylučování léčiva z buňky a související **mnohočetná léková rezistence** (MDR, *multidrug resistance*). Cytostatika jsou vypuzována pomocí transportérů z rodiny ABC (*ATP-binding cassette*). Mezi nejznámější patří P-glykoprotein, produkt genu *MDR1/ABCB1* a dále proteiny asociované s mnohočetnou lékovou rezistencí *MRP1/ABCC1*, *MRP4/ABCC4*, *MRP5/ABCC5*. Transport xenobiotik z jádra do cytoplazmy zprostředkovává „*lung resistance-related protein/major vault protein*“ (*LRP/MVP*). (Klener 2010 a Brodeur 2000)

**Exprese ABC transportérů** je v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> oproti parentální linii snížena (viz kap. 3.2.), takže zvýšený eflux ellipticinu z buňky nebude majoritním mechanismem rezistence (Procházka 2012), jako je tomu u neuroblastomové buněčné linie rezistentní na doxorubicin (UKF-NB-4<sup>DOXO</sup>). Doxorubicin je dnes vyžívané kancerostatikum a zvýšená exprese P-gp v UKF-NB-4<sup>DOXO</sup> je jednou z hlavních příčin rezistence na doxorubicin. (Poljaková 2008) Přestože je mechanismus cytotoxicity ellipticinu i doxorubicinu podobný (oba inhibují topoisomerasu II), nevzniká zde křížová rezistence. Cytometrická analýza však prokázala zvýšenou expresi LRP a MRP2 v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči parentální linii. (Procházka 2012) Zajímavý z hlediska rezistence je hlavně **protein LRP**. Ten je hlavní složkou molekulárních „trezorů“ (*vaults*), ribonukleoproteinových komplexů, které se mohou podílet na transportu xenobiotik z jádra do cytoplazmy, intracelulární kompartmentalizaci, exocytóze, efluxu z buňky a udržování genomové stability, jak je vidět na obrázku 11 na následující straně. Součástí komplexu je také poly(ADP-ribose)polymerasa 4 (PARP4), protein asociovaný s telomerasou (TAP1) a vRNA (*vaultRNA*). (Mossink 2003)

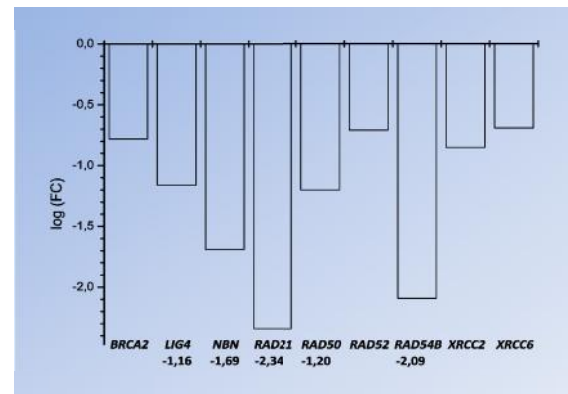


**Obrázek 11 – a) Mechanismus účinku molekulárních „trezorů“ na xenobiotika. Černé tečky značí xenobiotikum, které difunduje do cytosolu a do jádra. Transport xenobiotika 1- a 2- z jádra, 3- k efluxním pumpám, 4- k exocytotickým váčkům. b) Rekonstrukce „trezorového“ komplexu pomocí kryoelektronové mikroskopie. upraveno podle (Mossing 2003)**

Ellipticin tvoří po enzymatické aktivaci adukty s DNA. Dalším předpokládaným mechanismem rezistence by tedy mohla být zvýšená exprese proteinů opravujících DNA v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií, což se opravdu potvrdilo u proteinů zprostředkovávající „excizní“ opravy nukleotidů (*nucleotide excision repair*, NER). (obr. 12) (Procházka 2012) Exprese poly(ADP-ribose)polymerasy 1 (PARP1), která se účastní „excizních“ oprav bazí (BER), byla v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> také zvýšena oproti parentální linii. Tento enzym je často spojován s rezistencí na protinádorová léčiva. (Klener 2010) Exprese se naopak snížila u proteinů opravujících dvojlátknové zlomy DNA. (obr. 13) (Procházka 2012)



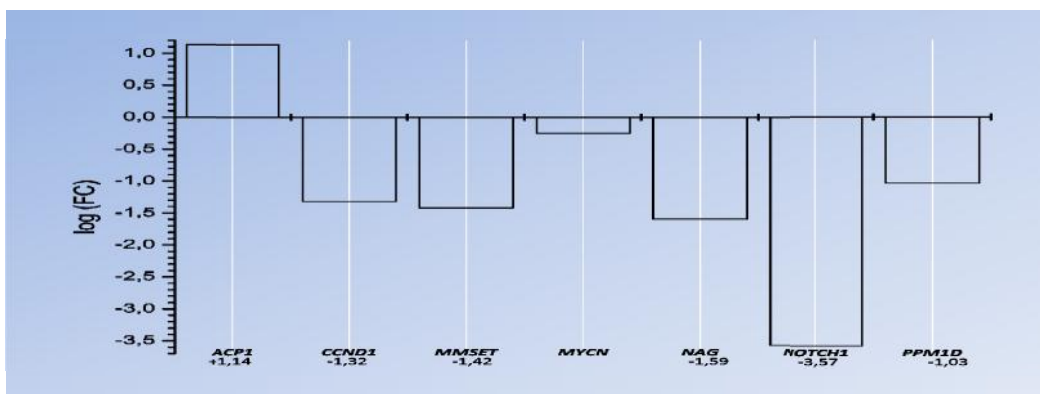
**Obrázek 12 – Rozdílná exprese genů v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií, jejichž produkty se účastní dějů NER a BER.**



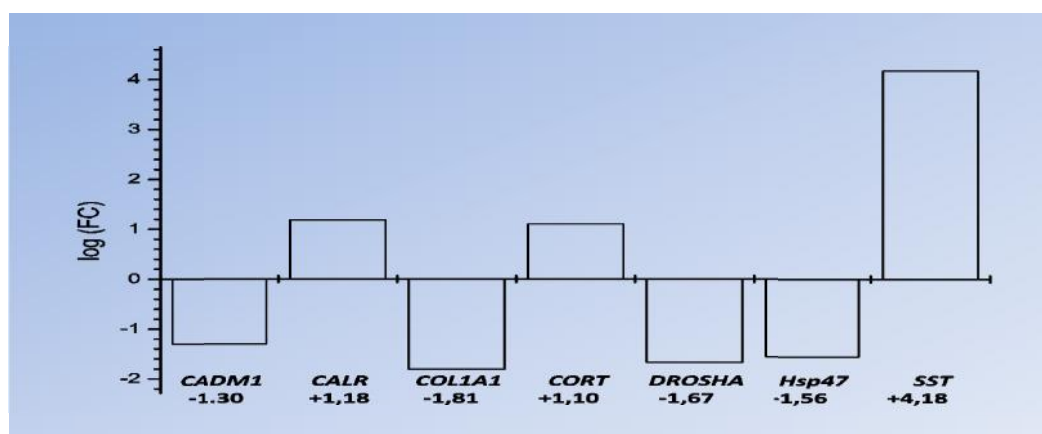
**Obrázek 13 – Rozdílná exprese genů v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií, jejichž produkty se účastní oprav dvojlátknových zlomů DNA. Vyznačeny jsou jen signifikantní změny v expresi.**

Pro další objasnění mechanismu rezistence byly vyhledány publikace o genech, u kterých byla zaznamenána signifikantní změna exprese v NB linii rezistentní na ellipticin. Z nich pak byly vybrány jen ty geny, které slouží jako **independentní příznivé/nepříznivé prognostické faktory neuroblastomu**. (obr. 14 a 15 na následující straně)





**Obrázek 14 – Rozdílná exprese genů v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií, které jsou nepríznivými prognostickými faktory NB. Vyznačeny jsou jen signifikantní změny v expresi.** Reference: ACP1 (Malentacchi 2005), CCND1 (Molenaar 2008), MMS1 (Hudlebusch 2011), MYCN (Brodeur 2003), NAG (Kaneko 2007), NOTCH1 (Chang 2010), PPM1D (Saito-Ohara 2003)



**Obrázek 15 – Rozdílná exprese genů v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií, které jsou independentními příznivými prognostickými faktory NB.** Reference: CADM1 (Nowacki 2008), CALR (Hsu 2005), COL1A1 (Yang 2004), CORT (Ejeskär 2000), DROSHA (Lin 2010), Hsp47 (Yang 2004), SST (Ejeskär 2000)

### 3.1. GENETICKÝ PROFIL LINIE UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> REZISTENTNÍ NA ELLIPTICIN

Pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH) byl porovnán genom parentální linie UKF-NB-4 a dceřiné linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>, všechny změny jsou popsány na obr. 16 a tab. 2 na str. 34.

Pro NB buněčnou linii UKF-NB-4 je charakteristická amplifikace oblasti krátkého raménka p24 chromosomu 2, kde se nachází protoonkogen *MYCN*, dále delecce krátkého raménka p32-pter chromosomu 1 a trisomie dlouhého raménka chromosomu 17. V linii UKF-NB-4 však není pozorována delecce dlouhých ramének chromosomů 11 a 14 (11q a 14q). (Procházka 2012) Tyto znaky jsou typické pro vysoce rizikový neuroblastom (*high risk neuroblastoma*), jehož léčba je zatím velmi neúspěšná. (Brodeur 2003)

Mezi nejvýznamější změny vzniklé v průběhu vývoje rezistence na ellipticin v linii UKF-NB-4 patří ztráta dlouhého raménka chromosomu 17 a výsledná disomie 17q, a také delece oblasti, kde se nachází gen *MYCN* (2p24).

V oblastech chromosomů, které byly deletovány v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentálními liniemi, se nacházejí geny, které kódují proteiny ovlivňující ellipticin nebo jsou ellipticinem ovlivňovány. (tab. 1) Již v minulé kapitole byly popsány ABC transportéry (P-gp, MRP1, MRP5, ABCA5), v deletovaných oblastech se nacházejí také topoisomerasy (TOP1, TOP2A/B), jeden z cílů cytotoxického účinku ellipticinu. Další skupinou jsou proteiny aktivující ellipticin. Patří mezi ně cytochromy P450 (CYP3A4, CYP2D6), peroxidasy (LPO, MPO) a sulfotransferasy (SULT1A1/2). U genů pro NADPH:cytochrom P450 reduktasu (POR) a cytochrom b<sub>5</sub> (CYB5), jejichž proteinové produkty hrají významnou roli při aktivaci ellipticinu pomocí CYP, byla také pozorována delece. Díky těmto změnám snášejí rezistentní linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vyšší dávky ellipticinu. V tabulce 3 na následující straně jsou uvedeny genomové změny v „pre-rezistentní“ linii UKF-NB-4 porovnané s parentální. Zajímavé je, že většina amplifikací/delecí genů proběhla v první fázi kultivace UKF-NB-4 s ellipticinem. Již v NB linii „pre-rezistentní“ lze najít delece oblastí s geny, které byly popsány výše. Jedinou výjimkou je jedna z isoform topoisomerasy II (TOP2B) a také ABC transportér MRP5, jejichž geny se nacházejí na terminální části dlouhého raménka chromosomu 3, která byla deletována až po dlouhodobější kultivaci UKF-NB-4 s ellipticinem.

**Tabulka 1 – Chromosomální lokalizace genů, jejichž produkty se podílí na metabolismu ellipticinu a u kterých došlo během vývoje rezistence na ellipticin v UKF-NB-4 k deleci.**

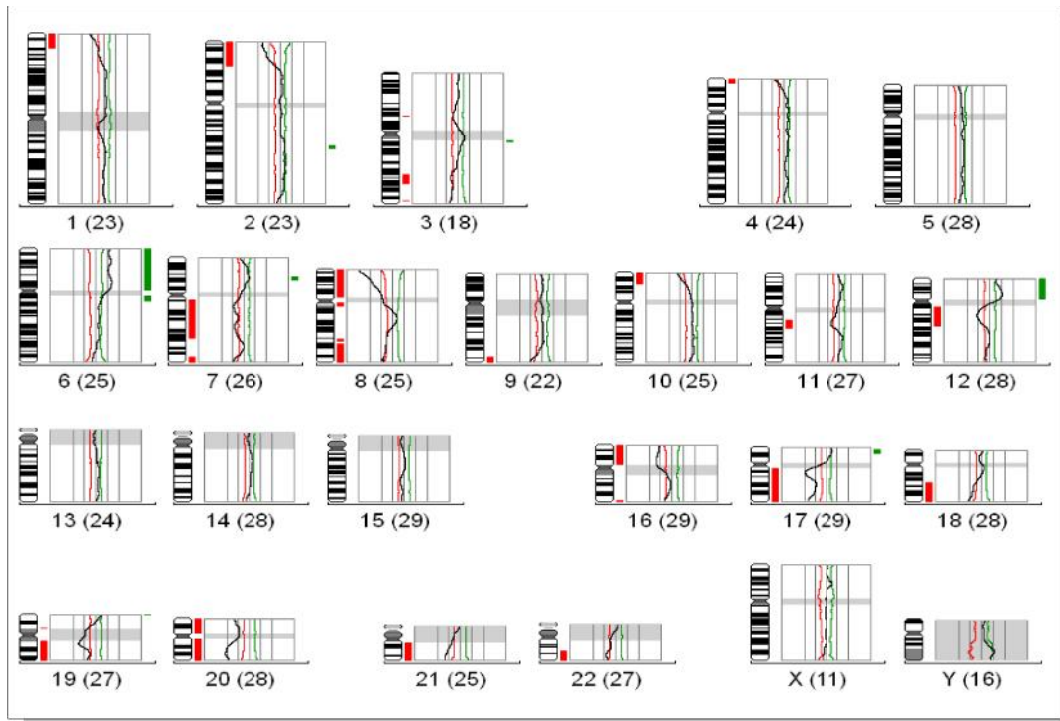
	chromosom
<i>ABCA5</i>	17q24.3
<i>ABCB1</i>	7q21.12
<i>ABCC1</i>	16p13.1
<i>ABCC5</i>	3q27
<i>CYP5</i>	18q23
<i>CYP2D6</i>	22q13.1
<i>CYP3A4</i>	7q21.1
<i>LPO</i>	17q23.1
<i>MPO</i>	17q23.1
<i>POR</i>	17q11.2
<i>SULT1A1</i>	16p12.1
<i>SULT1A2</i>	16p12.1
<i>TOP1</i>	20q12-q13.1
<i>TOP2A</i>	17q21-q22
<i>TOP2B</i>	3q24

**Tabulka 2 – Amplifikované a deletované oblasti v DNA neuroblastomové buněčné linie rezistentní UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> ve srovnání s linií UKF-NB-4. Tučně jsou vyznačeny oblasti, které kódují proteiny ovlivňující metabolismus ellipticinu.**

amplifikace	delece		
+6q14-pter	-1p35-pter	<b>-8q22-qter</b>	<b>-17q</b>
+12p	-2p21-pter	-9q34.1-qter	-18q21.1-qter
+17p12-pter	<b>-3q24-qter</b>	-10p13-pter	<b>-19q</b>
	-4p16	-11q13.2-14.1	<b>-20</b>
	<b>-7q11.2-31.3</b>	-12q12-21.1	-21
	-7q36	<b>-16p</b>	<b>-22q13.1-qter</b>
	-8q11.2-pter		

**Tabulka 3 – Amplifikované a deletované oblasti v DNA neuroblastomové buněčné linie “pre- rezistentní” na ellipticin UKF-NB-4 ve srovnání s linií UKF-NB-4.**

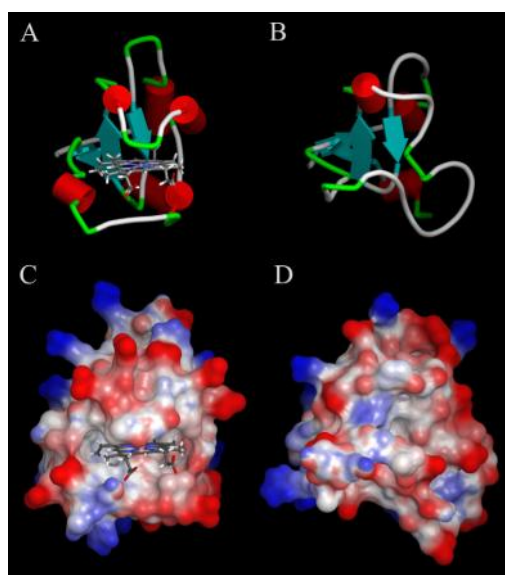
amplifikace	Delece		
+6pter-6q21	-1p32.3-pter	-11q13.1-14.1	-18q12.3-qter
+12p	-2p21-pter	-12q12-q15	-19
	-7q11.2-31.3	-16p	-20
	-8p	-17q	-22
	-8q21.3-qter		



**Obrázek 16 – Komparativní genomová hybridizace porovnávající rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> a parentální linii UKF-NB-4. Pod každým chromosomem je uvedeno jeho číslo a v závorce počet prověřovaných chromosomů. Jak je vidět porovnáním s tabulkou 2 a 3, většina genomových změn proběhla v první fázi vývoje rezistence na ellipticin. převzato z (Procházka 2007)**

### 3.2. ZMĚNY EXPRESE GENŮ OVLIVŇUJÍCÍCH METABOLISMUS ELLIPTICINU V LINII UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> VE SROVNÁNÍ S PARENTÁLNÍ LINIÍ

Ellipticin je enzymaticky oxidován **cytochromy P450 a peroxidasami**. (Stiborová 2004a a 2006) Expze cytochromů P450 a peroxidas v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči parentální linii UKF-NB-4 zůstala nezměněná (nesignifikantní změna expze). (obr. 19, str. 37) Pomocí qRT-PCR však byla zaznamenána zvýšená expze CYP3A4 a COX-1. (Procházka 2012) Expze NADPH:cytochrom P450 reduktasy (POR), která je součástí systému oxidas se smíšenou funkcí (MFO) a vytváří aktivní komplex s cytochromy P450, není v lidské NB linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> ve srovnání s parentální linií UKF-NB-4 ovlivněna. Naproti tomu expze genu pro NAD(P)H:chinonoxidoreduktasu (NQO1), která redukuje nízkomolekulární xenobiotika, byla v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> signifikantně snížena. (obr. 19., str. 37)



**Obrázek 17 – Srovnání 3D struktury cytochromu  $b_5$  (A, C) a apocytochromu  $b_5$  (B, D).** převzato z (Kotrbová 2011)

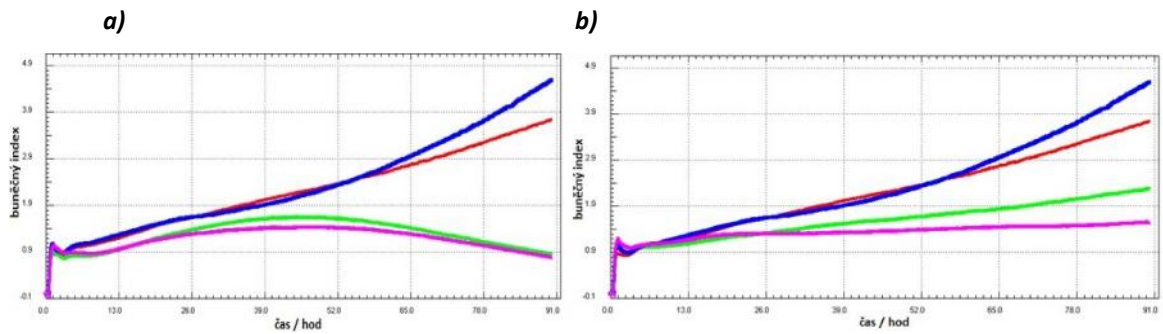
Expze **cytochromu  $b_5$**  se naopak v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči UKF-NB-4 zvýšila. (obr. 19, str. 37) Ellipticin zvyšuje hladinu cytochromu  $b_5$ , ale mechanismus tohoto účinku zatím nebyl objasněn. (Kotrbová 2011) Cytochrom  $b_5$  moduluje účinnost CYP3A4 (Schenkman 2003) a specifitu hydroxylace ellipticinu enzymy CYP3A4 ve prospěch aktivačních metabolitů. (Stiborová 2012) a CYP1A1/2. (Kotrbová 2011) CYP1A1/1A2 oxiduje ellipticin v přítomnosti POR především na detoxifikační produkt 9-hydroxyellipticin. Pokud je

v systému přítomný ještě cytochrom  $b_5$ , nejčastějšími produkty jsou cytotoxické formy 12-hydroxy, 13-hydroxyellipticin a N(2)-oxid ellipticinu a jeden detoxifikační, 7-hydroxyellipticin. Následná tvorba DNA aduktů pak vysoce korelovala se zvýšenou tvorbou cytotoxických metabolitů. Přítomnost cytochromu  $b_5$  tedy může způsobit konformační změnu v CYP1A1 a ovlivnit tím i místo hydroxylace ellipticinu. Modulace účinku CYP1A je možná jen pomocí holo-cytochromu  $b_5$ . Hem je důležitý nejen pro přenos 1 elektronu, ale i pro konformaci celého proteinu. (Kotrbová 2011) (obr. 17, str. 35)

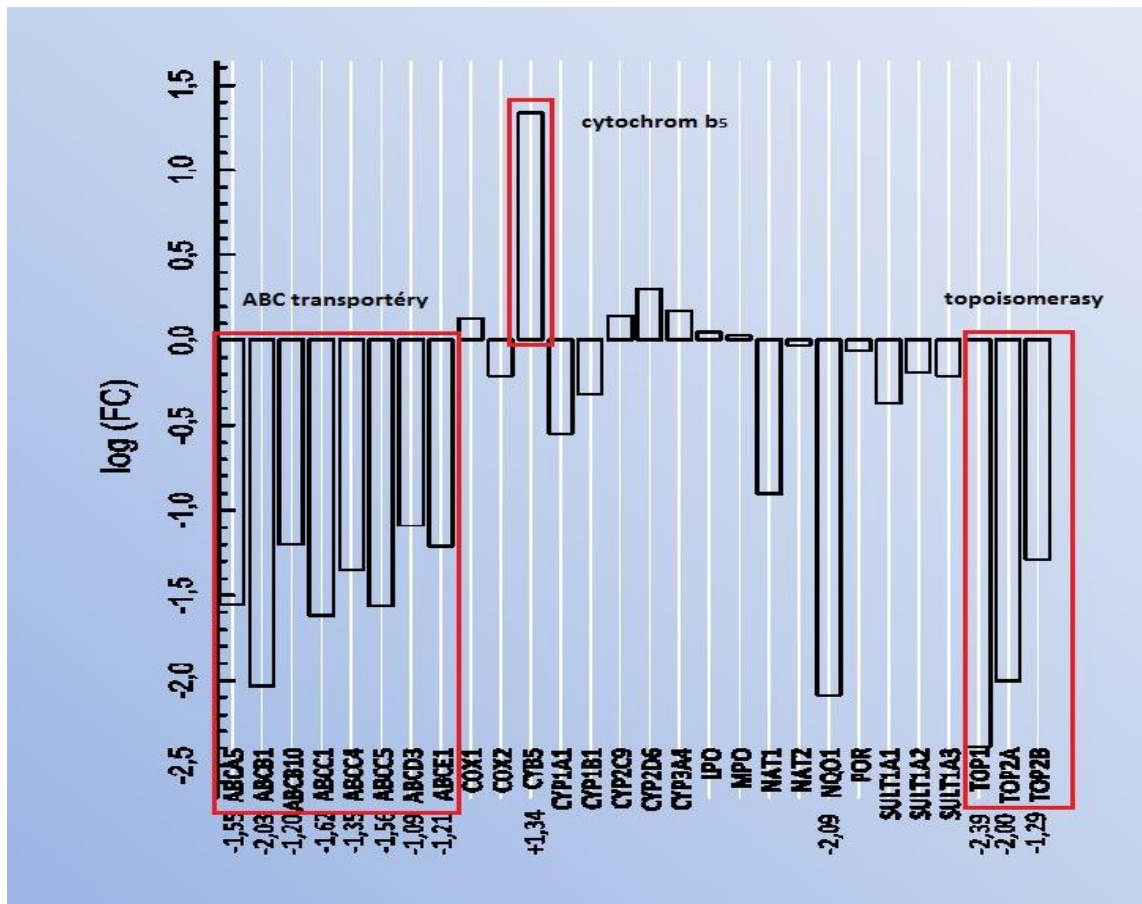
Podobné výsledky byly zjištěny pro CYP3A4, majoritním produktem oxidace za přítomnosti cytochromu  $b_5$  je 13-hydroxyellipticin. Expres **sulfotransferas a N-acetyltransferas**, které zvyšují počet DNA aduktů tvořených 13-hydroxyellipticinem (Stiborová 2012), zůstala nezměněna nebo se nesignifikantně snížila v linii rezistentní na ellipticin v porovnání s parentální linií UKF-NB-4. (obr. 19, str. 37)

Výsledky tedy naznačují, že při zvýšené expresi CYP3A4 a cytochromu  $b_5$ , při nesignifikantně snížené expresi CYP1A1, a při nesignifikantně zvýšené expresi CYP2C9, CYP2D6 (obr. 19, str. 37), budou hlavními produkty oxidace ellipticinu cytotoxické metabolity, což bude korelovat se zvýšeným počtem aduktů s DNA (Kotrbová 2011 a Stiborová 2012) v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin.

To je ale v rozporu s pozorováním *in vitro*, kdy v NB linii rezistentní na ellipticin dochází k poklesu tvorby aduktů s DNA a snížení akumulace ellipticinu v jádře. (Procházková 2012) S tím také klesá účinnost ellipticinu jako inhibitoru topoisomerasy II a interkalačního činidla. (Froelich-Ammon 1995) Expres **topoisomerasy II** (TOP2A, TOP2B) i topoisomerasy I (TOP1) byla navíc v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> snížena. (obr. 19, str. 37) Jednou z příčin rezistence může být intracelulární sekvestrace ellipticinu pomocí **vakuolární (V)-ATPasy**, ATP dependentní protonové pumpy. (Hraběta 2011) Jedná se o enzymový komplex, který je nezbytný pro acidifikaci nitrobuňkových kompartmentů a protonované molekuly mohou být uvězněny v těchto vakuolách díky své hodnotě  $pK_a$  a transmembránovému rozdílu pH. (Spugnini 2010) Ellipticin je slabou kyselinou s  $pK_a = 7,4$  a v mírně kyselém prostředí nádorové buňky se vyskytuje ve své protonované formě. (Froelich-Ammon 1995) Tvorba vakuol a intravezikulární fluorescence ellipticinu klesla po léčbě inhibitorem V-ATPasy bafilomycinem A1 a lysotropním léčivem chlorokvinem, s tím stoupla i účinnost ellipticinu. (obr. 18 na následující straně) (Hraběta 2011)



Obrázek 18 – Křivky buněčné proliferace UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>. Modrá křivka – kontrolní medium, červená křivka - UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> s 1 μM ellipticinem, a) zelená křivka – chlorokvin, růžová křivka – chlorokvin + 1 μM ellipticin, b) zelená křivka – bafilomycin A1, růžová křivka – bafilomycin A1 + 1 μM ellipticin.<sup>1</sup>



Obrázek 19 – Rozdílná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin v porovnání s parentální linií, jejichž produkty ovlivňují metabolismus ellipticinu nebo jsou ellipticinem ovlivňováni. (ABC transportéry – ABCB1 = P-glykoprotein, ABCC1 = MRP1, ABCC4 = MRP4) Významná je především snížená exprese ABC transportérů, topoisomeras a zvýšená exprese cytochromu b<sub>5</sub>. Pod zkratkami názvů genů jsou zmíněny jen signifikantní hodnoty změny exprese log (FC).

<sup>1</sup> Data buněčné proliferace byla poskytnuta prof. MUDr. Tomášem Eckschlagerem, CSc. z Kliniky dětské hematologie a onkologie, Univerzita Karlova v Praze, 2. Lékařská fakulta.

### 3.3. ZMĚNY EXPRESE GENŮ V ZÁVISLOSTI NA AMPLIFIKACI MYCN V LINII UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> VE SROVNÁNÍ S PARENTÁLNÍ LINIÍ

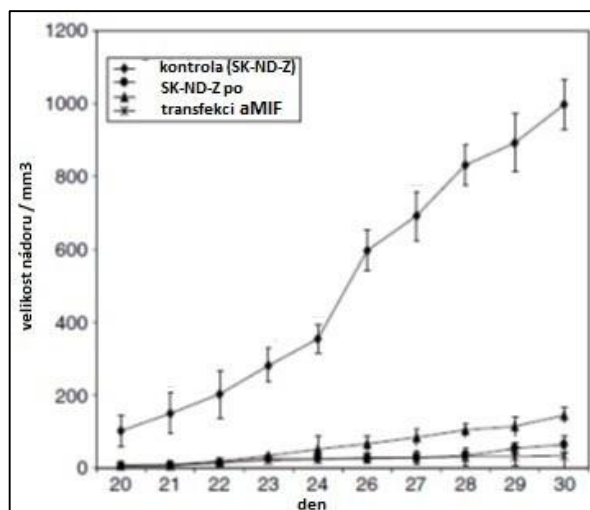
**Protoonkogen MYCN** je negativním prognostickým faktorem neuroblastomu a stimuluje proliferaci buněk NB. Byla nalezena korelace mezi počtem kopií genu *MYCN* a malignitou onemocnění. (Brodeur 2003) Metoda „DNA microarray“ prokázala jen nesignifikantně sníženou expresi *MYCN*, qRT-PCR poté sníženou expresi *MYCN* v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči UKF-NB-4 potvrdila. Již od 10 kopií tohoto genu v neuroblastomu lze pozorovat zvýšenou agresivitu nádoru. (Marris 1999) V jádře buněk parentální linie UKF-NB-4 se nachází 66 kopií 2p24.3, kde se gen nachází, v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> bylo zjištěno pomocí metody iFISH už jen 42 kopií. (Procházka 2012) Kromě toho CGH prokázala delecí terminální oblasti krátkého raménka chromosomu 2 v NB linii rezistentní na ellipticin ve srovnání s parentální UKF-NB-4. Je ale zajímavé, že k této změně došlo již v linii UKF-NB-4 „pre-rezistentní“ na ellipticin.

Proto byly mezi publikovanými daty vyhledány geny, jejichž produkty ovlivňují nebo jsou ovlivňovány *MYCN*, a jejichž exprese v rezistentní NB linii vůči parentální linii UKF-NB-4 byla signifikantně změněna. Celkem bylo nalezeno 14 genů, z nichž 4 se nacházely v oblastech chromosomů, které byly amplifikovány/deletovány v průběhu 1. fáze kultivace UKF-NB-4 s ellipticinem za vzniku linie „pre-rezistentní“ na ellipticin (FAK, NAG, PPM1D, P-gp). U těchto genů je pozorována v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> snížená exprese v porovnání s parentální linií. (obr. 21 a tab. 4, str. 40) Tyto změny jsou pro neuroblastom velmi příznivé. Znamenají lepší odpověď na léčbu (NAG) (Kaneko 2007), snížení viability NB a podporu apoptózy (FAK) (Beierle 2007), snížení buněčného růstu (PPM1D) (Saito-Ohara 2003) a snížení efluxu xenobiotik z NB (P-gp). (De Cremoux 2007) Expresе těchto 4 genů vysoce souvisí s expresí *MYCN*. NAG se nachází, stejně jako *MYCN*, na krátkém raménku p24 chromosomu 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), kde došlo během 1. fáze kultivace UKF-NB-4 s ellipticinem k delecí. (pro srovnání tab. 3, str. 34) *MYCN* přímo stimuluje expresi FAK (Beierle 2007) a nepřímo expresi PPM1D. (Saito-Ohara 2003) U P-gp byla nalezena inverzní korelace s expresí *MYCN* (Cremoux 2007), takže delecí 7q21.12, kde se gen *ABCB1* nachází (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), a snížená exprese P-gp, je pravděpodobně nezávislá na *MYCN*.



**Při dlouhodobější kultivaci** ellipticinu v buněčné linii UKF-NB-4, tedy v čase mezi vznikem „pre-rezistentní“ NB linie na ellipticin a linie rezistentní (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>), však dochází ke změnám více nepříznivým, k amplifikaci a zvýšené expresi *MIF* a *CALR*, a zároveň k delecii a snížené expresi *HDAC2* a *NOTCH1* v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií. (obr. 21, str. 40) Zejména **inhibiční faktor migrace makrofágů** (MIF) může způsobovat významné problémy v NB linii rezistentní na ellipticin. MIF totiž indukuje expresi *MYCN* a zvyšuje hladinu proteinu MYCN, pokud je jeho hladina nízká, a navíc indukuje přemístění proteinu MYCN z cytoplazmy do jádra. (Ren 2004) MIF zároveň zvyšuje proliferaci buněk NB. Při jeho inhibici *in vivo* v buňkách SK-N-DZ, které mají vysokou expresi MYCN, se zřetelně snížil objem nádoru. (Fan 2005 a 2006) (obr. 20) MIF zároveň podporuje angiogenezi a metastázování. (Ren 2006) Také dochází k narušení zpětnovazebné autoregulace exprese *MYCN*, kterou řídí **histondeacetylase 2** (HDAC2). (Kim 2004) Výsledkem by mohla být zvýšená exprese *MYCN* v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin v porovnání s „pre-rezistentní linií“. Na druhou stranu je při dlouhodobější kultivaci podpořena neurodiferenciace (Hsu 2006 a Chang 2010) zvýšenou expresí kalretikulinu (*CALR*) a sníženou expresí *NOTCH1* v rezistentní linii na ellipticin vůči parentální linii UKF-NB-4. (obr. 21 na následující straně)

Na závěr této kapitoly budou ještě zmíněny geny související s *MYCN*, u nichž při vývoji rezistence na ellipticin v linii UKF-NB-4 nedošlo ke genomovým změnám, ale byla detekována jejich snížená exprese v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči parentální linii. (obr. 21 na následující straně) Dochází ke zvýšení pH stresu v NB buňkách (*MCT1*) (Fang 2006), snížení efluxu xenobiotik z NB (*MRP1*, *MRP4*) (Norris 2005 a Henderson 2011), ale také k negativním procesům – invazi a metastázování (*CADM1*) (Michels 2008), zvýšení proliferace (*DKK1*) (Koppen 2007 a Tringali 2012) a snížení exprese miRNA (*DROSHA*), což je nepříznivým prognostickým faktorem NB. (Lin 2010)

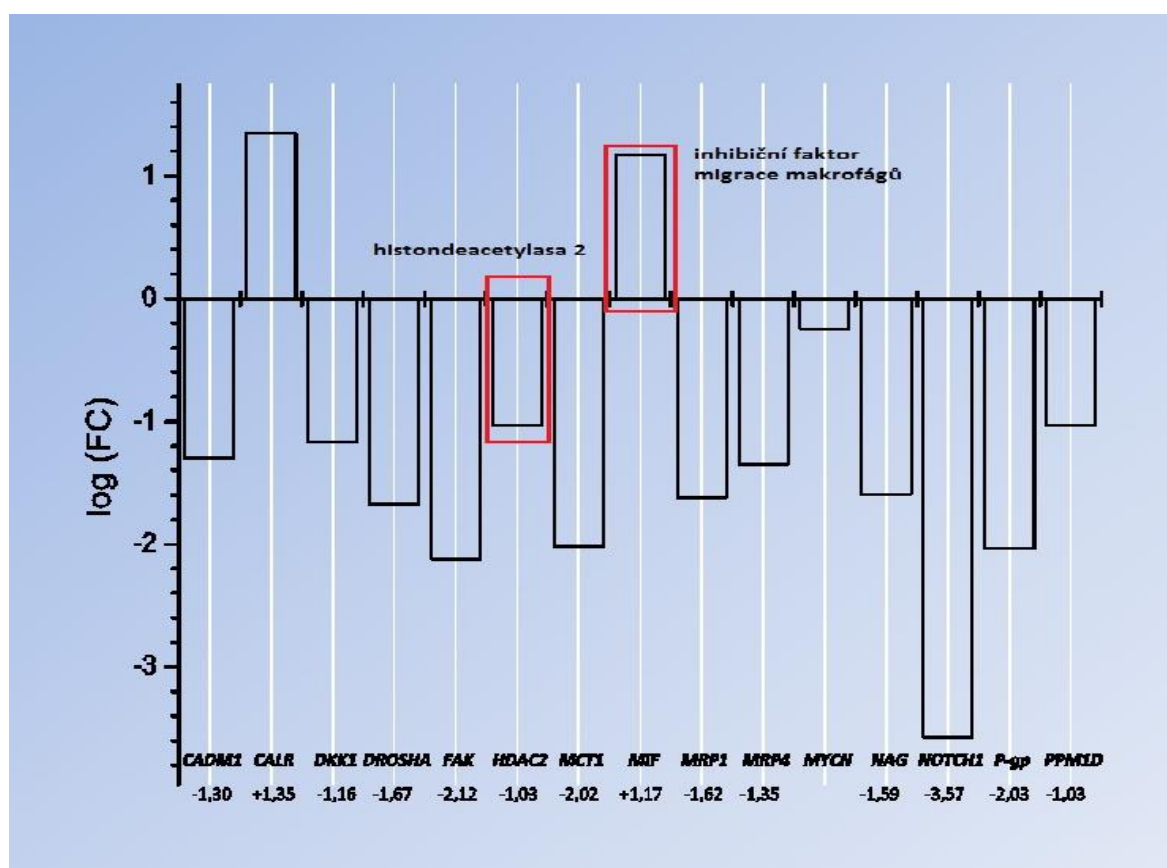


**Obrázek 20 – Růstové křivky buněk SK-N-DZ *in vivo*, horní křivka je kontrolní, spodní křivky po transfekci a („antisense“)MIF. upraveno podle (Ren 2006)**



Tabulka 4 – Geny, jejichž exprese souvisí s amplifikací protoonkogenu *MYCN* v neuroblastomech. V pravém sloupci jsou popsány buněčné linie/nádory neuroblastomu, kde tato spojitost byla popsána. Reference jsou popsány v textu u každého příslušného genu.

	buněčné linie/nádory
<b>CADM1</b>	CHP-134, CHP-901, CLB-GA, GI-C-IN-1, LA-N-1, LA-N-5, NB-13, NB-19, N206, NBL-S, NGP, NLF, SHEP, SJNB-1, SJNB-6, SJNB-8, SJNB-10, SJNB-1.2, SK-N-AS, SKN-BE (1n), SK-N-BE (2c), SK-N-FI, SMS-KAN, SMS-KCNR, STA-NB-3, STA-NB-8, STA-NB-9, STA-NB-10, STA-NB-1.2, TR-14, UHG-NP
<b>CALR</b>	85 pacientů s neuroblastomem
<b>DKK1</b>	IMR-32, SHEP-21N
<b>DROSHA</b>	66 primárních nádorů od pacientů
<b>FAK</b>	IMR-32, SK-N-AS
<b>HDAC2</b>	SK-N-SH, NLF, SHEP-21N
<b>MCT1</b>	SK-N-SH, CHP134, IMR-32, NGP
<b>MIF</b>	SK-N-DZ, SK-N-SH
<b>MRP1</b>	209 pacientů s neuroblastomem
<b>MRP4</b>	209 pacientů s neuroblastomem
<b>NAG</b>	113 primárních nádorů od pacientů
<b>NOTCH1</b>	85 pacientů s neuroblastomem
<b>P-gp</b>	29 pacientů s pokročilým neuroblastomem
<b>PPM1D</b>	KP-N-RT, KP-N-SIFA, KP-N-SILA, KP-N-YN, KP-N-YS, KP-N-AYR, KP-N-TK, KP-N-AY, MP-N-TS, KP-N-NY, KP-N-NH, MP-N-MS, SMS-KCN, SJN-KP, SK-N-SH, SK-N-DZ, IMR32, SMS-KAN, NB-1, SK-N-AS, CHP134, SMS-KCNR, GOTO, SJ-N-CG, RT-BMV-C6



Obrázek 21 – Rozdílná exprese genů v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentálními liniemi, u kterých byla nalezena spojitost s amplifikací *MYCN*. Vyznačeny jsou jen signifikantní změny log (FC).

### 3.4. ZMĚNY EXPRESE APOPTOTICKÝCH GENŮ V LINII UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> VE SROVNÁNÍ S PARENTÁLNÍ LINIÍ

V UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> jsou narušeny apoptotické dráhy, vnější (TNFR a FAS signalizace) a vnitřní apoptotická dráha, což bylo zjištěno pomocí analýzy DAVID, kdy byly geny se signifikantní změnou exprese v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> oproti parentální UKF-NB-4 rozřazeny podle signalizací, kterých se účastní. (*Nature Protocols 2009*)

**Vnější apoptotická dráha** začíná navázáním ligandu na TNF receptor nebo Fas receptor. „MAP-kinase activating death domain“ (MADD) je adaptorový protein, který interaguje s TNF receptorem a aktivuje apoptotickou MAPK kaskádu. „Fas associated factor 1“ (FAF1) zase interaguje s Fas receptorem a také zprostředkovává nebo iniciuje apoptózu. (*Nature Protocols 2009*) Exprese MADD i FAF1 je v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> ve srovnání s parentální linií snížena. Nejvýznamější změny v expresi byly pozorovány u proteinů štěpených efektorovou kaspasou 3: ARHGDI B/G4-GDI, pRb, PARP, PRKDC/DNAPK, DFFB/CAD a PAK2. Pouze exprese ARHGDI B a PARP je v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> zvýšena oproti parentální linii, u ostatních výše zmíněných genů je snížena. (pRb, PRKDC, DFFB, PAK2) (obr. 22, str. 43) Snížená exprese retinoblastomového proteinu (pRb) podporuje průchod buňky G<sub>1</sub> fází buněčného cyklu. (*Klener 2010*) **PARP1** byla již zmíněna v kapitole 3. Je to enzym účastnící se oprav DNA mechanismem BER. Zvýšená aktivita PARP je spojována se zvýšenou rezistencí nádorových buněk vůči genotoxickému stresu. Inhibice PARP je jednou z protinádorových léčebných strategií a vede všeobecně k senzitivaci nádorových buněk vůči terapii. (*Klener 2010*) Snížená exprese v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> u dalších genů štěpených kaspasou 3 vede k narušení oprav dvojláknových zlomů v DNA (PRKDC) (*Chakravarthy 1999*) a potlačení fragmentace DNA (DFFB) (*Judson 2000*) Dále je potlačena apoptotická signalizace sníženou expresí v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> u mitogen aktivovaných proteinkinás (MAP3K1/MEKK, MAP3K7/TAK1). (obr. 22, str. 43) (*Nature Protocols 2009*) a u ceramidkinasy. (*Barth 2012*)

Narušena je i **vnitřní apoptotická dráha**. Především se jedná o proteiny z BCL2 rodiny, IAP/BIRP rodiny a antioxidanty v mitochondriích. Z BCL2 rodiny je významná zvýšená exprese v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> oproti parentální linii Bcl-2 a BAG1, které blokují apoptózu, a snížená exprese proteinu NOXA, který je naproti tomu proapoptotický. Jen exprese proapoptického proteinu BAD je zvýšená. U proteinů IAP/BIRP, blokátorů kaspas (*Klener*

2010), byla pozorována snížená exprese (IAP2, NAIP, BIRC6). Zároveň vzrostla exprese hlavních **antioxidantů v mitochondriích** superoxiddismutasy (SOD2) a peroxiredoxinu 5 (PRDX5) (obr. 23, str. 43), které chrání buňku před oxidativním stresem a před apoptózou. (De Simoni 2008 a Cecere 2010) Buňka NB linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> je tak odolnější vůči oxidačnímu stresu.

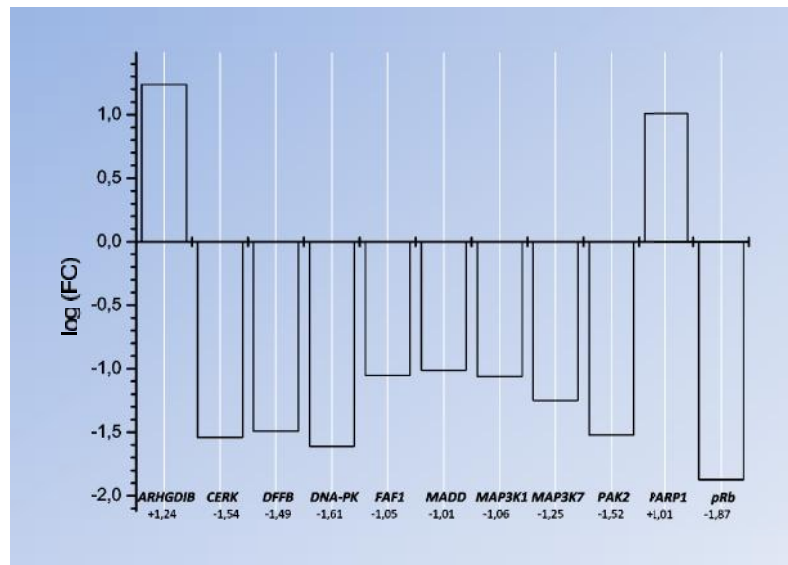
Při genotoxickém stresu DNA indukují apoptózu proteinkinasy ATM a ATR (Klener 2010), jejichž exprese je však v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> ve srovnání s UKF-NB-4 snížena. (obr. 23, str. 43)

Apoptóza indukovaná ellipticinem v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> je tedy velmi narušena inhibicí proapoptotických, aktivací antiapoptotických faktorů a již nevykazuje znaky, které jsou typické pro apoptózu indukovanou ellipticinem. (viz kapitola 1.4.2.) Stále je však možné v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> najít některé **proapoptotické faktory** se zvýšenou expresí jako je mitogen aktivovaná proteinkinasa 1 (MAPK1/ERK), endonukleasa G (ENDOG), nebo již zmíněný protein BAD, který může aktivovat apoptózu interakcí s antiapoptotickým Bcl-2. (obr. 23, str. 43)

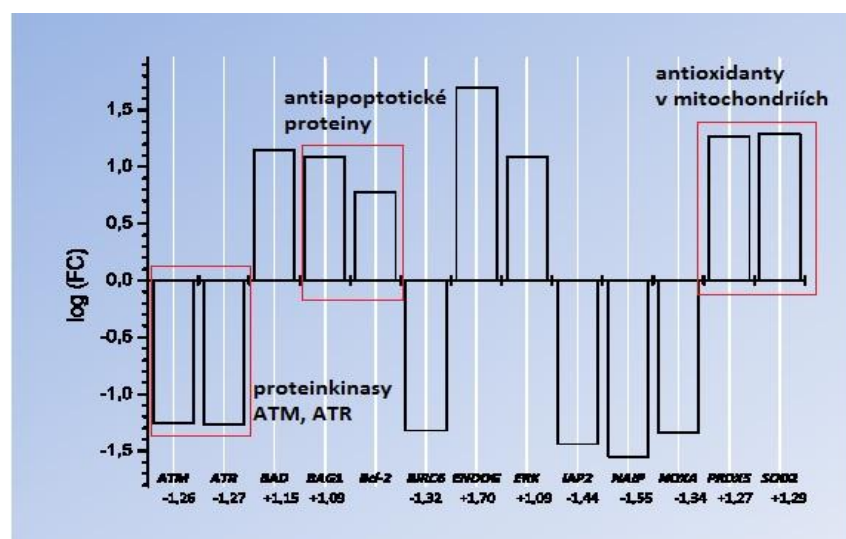
Snížená exprese je pozorována v rezistentní linii ve srovnání s parentální linii UKF-NB-4 také u faktorů s **antiapoptotickými účinky** nebo těch, jejichž snížená exprese podporuje apoptózu. Patří mezi ně SOX11, FAK, MRP1, ITPR1 (Jankowski 2006, Beierle 2007, Henderson 2011 a Haug 2000) některé zvyšují hladinu antiapoptotického Bcl-2 (SNAI2, CAST) (Vitali 2008 a Chetsawanga 2012) nebo snižují hladinu proapoptotického Bax (BAXI, TRPC1) (Dohm 2006 a Bollimunthaa 2006), další chrání před oxidativním stresem (NQO1, BAXI, WDR26) (Hyun 2012, Dohm 2006 a Zhao 2009), inhibují komplement (MCP) (Ciasque 1996), aktivují kaspasu 3 při inhibici (VPS41, WDR26, TRPC1) (Ruan 2010, Zhao 2009 a Bollimunthaa 2006) nebo snižují intracelulární pH při inhibici (MCT1) (Fang 2006). Antiapoptotická funkce proteinů zmíněných v tomto odstavci již byla popsána v NB buněčných liniích. (tab. 5, str. 44)

Z proteinů, o kterých bylo pojednáno v předchozím odstavci, je velmi významný **monokarboxylátový transportér** (MCT1), který exportuje z buňky monokarboxylové kyseliny (např. pyruvát, laktát) symportem s protony. (Fang 2006) Při jeho 105x snížené expresi by tedy mělo klesat intracelulární pH v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s linií UKF-NB-4. V této linii byla navíc zaznamenána zvýšená exprese laktátdehydrogenasy (u isoformy LDHB 15x, u LDHC 17x).

Při **nízkém pH** v cytosolu klesá schopnost ellipticinu narušovat oxidativní fosforylaci v mitochondriích (Schwaller 1995) (exprese enzymů oxidativní fosforylace a respirace je v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií zvýšena) (Procházka 2012) a hlavně se snižujícím se pH pod fyziologické hodnoty klesá počet aduktů tvořených 13-hydroxyellipticinem, protože se snižuje nukleofilita DNA potřebná k vazbě ellipticin-13-ylia na aminoskupinu guanosinu. (Stiborová 2012)



**Obrázek 22 – Rozdílná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin v porovnání s parentální linií. Produkty těchto genů se účastní vnější apoptotické signalizace. ARHGDI3, pRb, PARP, DNA-PK, DFFB a PAK2 jsou štěpeny kaspasou 3.**



**Obrázek 23 – Rozdílná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin v porovnání s parentální linií. Produkty těchto genů se účastní vnitřní apoptotické signalizace.**

**Tabulka 5 – Antiapoptotické geny, jejichž exprese se snížila v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentálními linií UKF-NB-4. V pravém sloupci jsou popsány buněčné linie/nádory neuroblastomu, kde byla popsána antiapoptotická funkce proteinů, které jsou kódovány těmito geny. Reference jsou popsány v textu u každého příslušného genu.**

	buněčné linie/nádory
<i>ABCC1/MRP1</i>	SH-SY5Y, BE(2)-C, SH-EP
<i>BAX11/TEGT</i>	SH-SY5Y
<i>BNIP3L</i>	Neuro2a
<i>CAST</i>	SH-SY5Y
<i>CD46/MCP</i>	IMR-32, SKN-SH
<i>ITPR1</i>	SH-SY5Y
<i>MCT1/SLC16A1</i>	IMR-32, Sk-N-SH, NGP, CHP134
<i>NQO1</i>	SH-SY5Y
<i>PRKDC</i>	SH-SY5Y
<i>PTK2/FAK</i>	SK-N-AS, SK-N-DZ, IMR-32, SK-N-BE(2)
<i>SNAI2</i>	SK-N-BE2c, SK-N-BE, SK-N-AS, SH-EP, KCNR, ACN, RN-GA, GI-CA-N, LAN-5, HTLA-230
<i>SOX11</i>	Neuro2a
<i>TRPC1</i>	SH-SY5Y
<i>VPS41</i>	SH-SY5Y
<i>WDR26</i>	SH-SY5Y

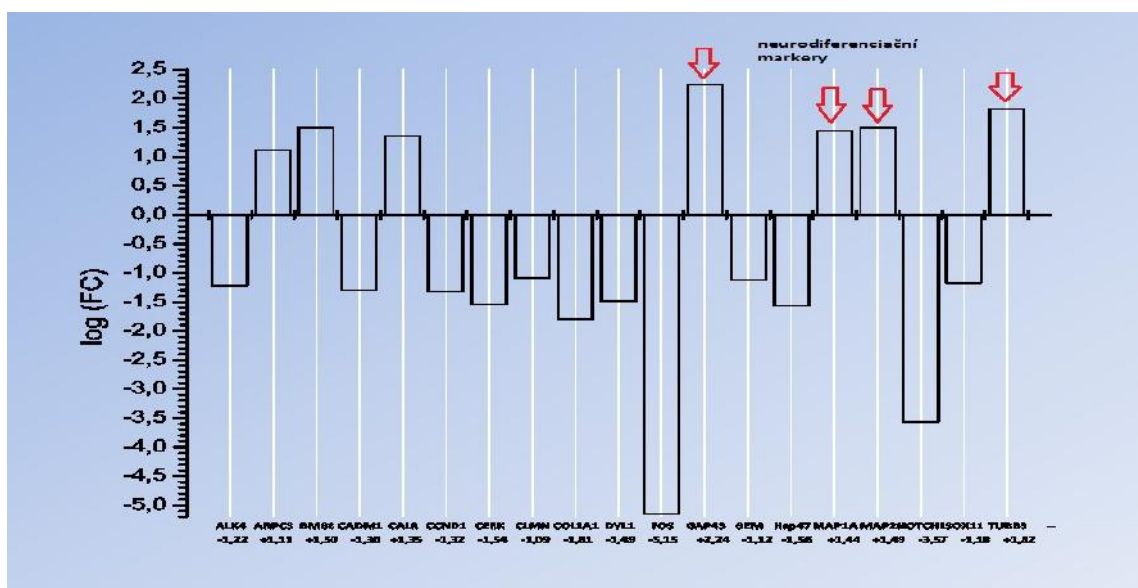
### 3.5. ZMĚNY EXPRESE GENŮ OVLIVŇUJÍCÍCH NEURODIFERENCIACI V LINII UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> VE SROVNÁNÍ S PARENTÁLNÍ LINIÍ

Charakteristickým rysem nádorových buněk je jejich nezralost/dediferenciace. Buněčná diferenciací je postupný proces, který je zajištěn souhrou mnoha signálních kaskád, činností různých transkripčních faktorů a je závislý na podnětech z tkáňového mikroprostředí. Progenitorová buňka, která vstoupí do diferenciacího procesu, ztrácí schopnost automatické sebeobnovy a počet mitóz je tedy od té doby omezen. V raném stádiu diferenciací stoupá proliferace buněk, což zajistí vysoký počet terminálně diferencovaných buněk, které se již nedělí (buňky v postmitotickém stádiu). (Klener 2010 a Koutecký 2004)

NB buněčná linie rezistentní na ellipticin UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vykazuje znaky neurodiferenciací. Dochází ke tvorbě neuritů (Procházka 2012) a je pozorována zvýšená exprese (v porovnání s parentálními linií UKF-NB-4) **neurodiferenciací markerů** (tab. 6 a obr. 24, str. 45) „microtubule-associated protein“ (MAP1A, MAP2), „growth-associated protein“ (GAP43) a tubulinu  $\beta 3$  (TUBB3). (Szebenyi 2005, Chang 2010 a Suzuki 2010) **Růst axonů/neuritů** podporují v NB proteiny ALK4, ARPC3, BM88/CEND1, CADM1, CALR, GEM, SOX11 a **růst dendritů** podporuje CLMN (Suzuki 2010, Jankowski 2006, Politis 2008, Michels 2008, Hsu 2005, Leone 2001, Marzinke 2012 a Haque 2004). Expresí tří z výše uvedených genů se v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentálními linií zvýšila (ARPC3, BM88, CALR) a u pěti dalších se

exprese naopak snížila (ALK4, CADM1, GEM, SOX11, CLMN). (obr. 24, str. 45) Tvorbu neuritů v NB inhibuje NOTCH1 a DVL1 (Chang 2010 a Fujimura 2009), exprese těchto proteinů byla v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> snížena. (obr. 24, str. 45)

Diferenciace v NB však není úplná, což potvrzují expresní data kolagenu I (COL1A) a jeho „chaperonu“ Hsp47 a také c-FOS. (obr. 24., str. 45) COL1A a c-FOS jsou totiž spojovány s diferencovaným stádiem NB. (Yang 2004 a Rudie 2001) Diferenciaci u NB naopak inhibují cyklin D1 (CCND1) a ceramidkinasa (CERK) (Molenaar 2008 a Murakami 2010), které však mají v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií sníženou expresi. (obr. 24)



Obrázek 24 – Změněná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin oproti parentální linii, jejichž produkty ovlivňují neurodiferenciaci.

Tabulka 6 – Geny, jejichž produkty byly popsány v primární literatuře v souvislosti s diferenciací v neuroblastomech. V pravém sloupci jsou uvedeny neuroblastomy, kde byla funkce proteinu popsána.

Gen	buněčné linie/nádory
ACVR1B/ ALK4	SK-N-SH-N
ARPC3	Neuro2a
BM88/CEND1	Neuro2a
CADM1/IGSF4	CHP-134, CHP-901, CHP-902R, CLB-GA, GI-C-IN, IMR-32, LA-N-1, LA-N-2, N206, NBL-S, NGP, NLF, NMB, SH-SY5Y, SH-SY5Y TrkA, SJNB-1, SJNB-8, SJNB-12, SK-NAS, SMS-KAN, SMS-KCNR, STA-NB-1.2.
CALR	68 pacientů s NB
CCND1	88 pacientů s NB, primární nádor
CERK	SH-SY5Y
CLMN	Neuro2a
COL1A1	NBL-W-S
DVL1	C1300
FOS	NBP <sub>2</sub>
GEM	SH-SY5Y, N1E-115
Hsp47/SERPINH	NBL-W-S
NOTCH1	SH-SY5Y
SOX11	Neuro2a

Deregulace kaskád jako je signální dráha NOTCH, WNT- $\beta$ -katenin, „Hedgehog“ (HH) nebo „transforming growth factor“  $\beta$  (TGF $\beta$ ) se podílí na nekonečné sebeobnově a poruchách diferenciaci nádorových kmenových buněk. (Klener 2010) Pomocí analýzy „Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery“ (DAVID) byly geny se signifikantní změnou v expresi v rezistentní linii na ellipticin vůči parentální linii UKF-NB-4 rozřazeny podle signalizací (Nature Protocols 2009) a bylo zjištěno, že v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> došlo k snížení exprese genů všech čtyř výše zmíněných signálních kaskád. (obr. 25-28, str. 47)

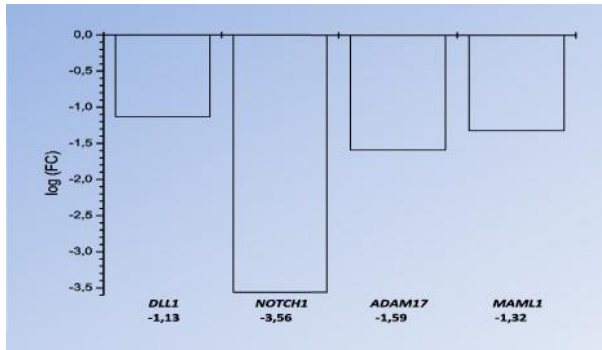
**NOTCH signalizace** (obr. 25, str. 47) je nepříznivým prognostickým znakem NB, zvláště pokud se jedná o expresi NOTCH1. Byla dokonce nalezena inverzní korelace mezi expresí NOTCH1 a CALR, GAP43 a MAP2, podporujících neurodiferenciaci. (Lahousse 2006) NOTCH signalizace hraje významnou roli v embryogenezi. Bylo zjištěno, že v NB blokuje neuronální diferenciaci a tvorbu neuritů. (Chang 2010)

**„Hedgehog“ (HH) signalizace** (obr. 26, str. 47) hraje významnou roli při embryonálním vývoji neurální lišty, ze které NB vzniká. (Brodeur 2003) U nádorů dochází k aberantní reaktivaci této signalizace. (Klener 2010) Aktivace HH v NB narozdíl od jiných nádorů vyvolá diferenciaci a je spojována s příznivým vývojem onemocnění, protože exprese genů PTCH a SMO negativně koreluje s MYCN amplifikací. (Souzaki 2010 a Shahi 2008)

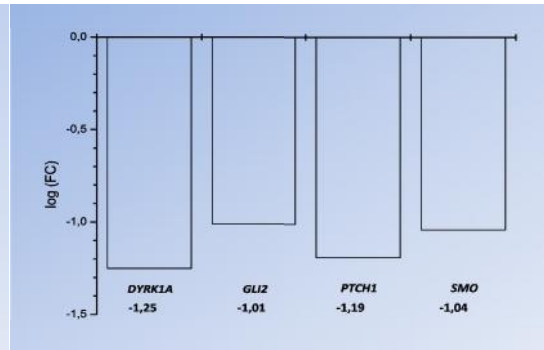
**„Transforming growth factor  $\beta$ “ (TGF $\beta$ ) signalizace** (obr. 27, str. 47) se podílí nejen na embryogenezi a morfogenezi, ale i na diferenciaci, motilitě, proliferaci a apoptóze. V normálních tkáních má tato signalizace silné antiproliferační účinky, u mnoha nádorů však vede k agresivnímu a nediferencovanému fenotypu. (Klener 2010)

**WNT- $\beta$ -katenin signalizace** (obr. 28, str. 47) je nezbytná pro správný průběh embryogeneze a morfogeneze. Ligandy Wnt se váží na receptory z rodiny „frizzled“ (FZD), signál pak přenáší proteiny dishevelled (DVL), poté dojde k transkripci cílových genů (MYC, cyklin D1) pomocí transkripčních faktorů regulovaných  $\beta$ -kateninem. Stejně jako NOTCH signalizace udržuje WNT- $\beta$ -katenin signalizace buňky v nediferencovaném stavu. (Klener 2010)

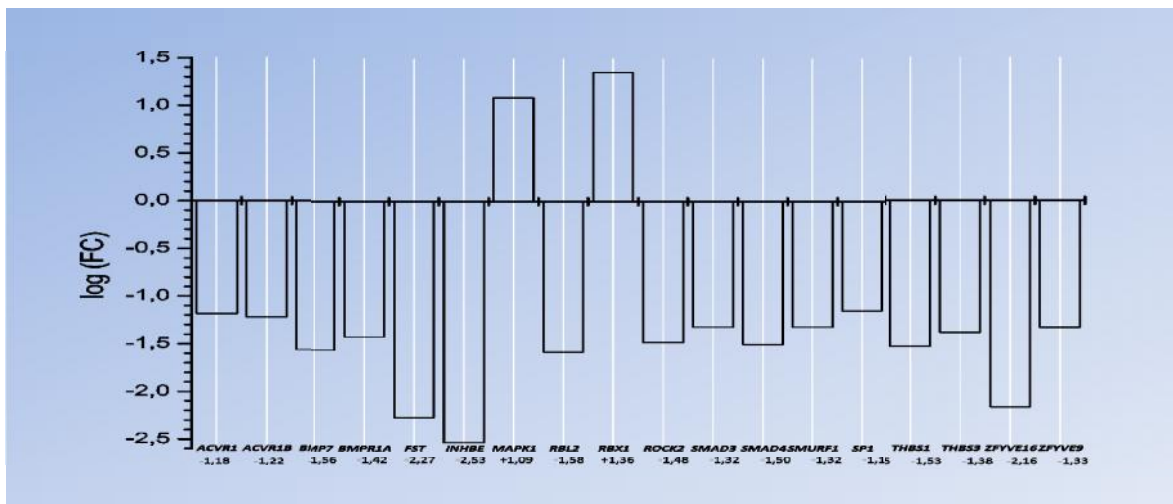
Inhibitory těchto čtyř signálních drah jsou využívány v protinádorové léčbě. (Klener 2010) V NB linii rezistentní na ellipticin UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> jsou tyto dráhy potlačeny, což podporuje diferencovaný fenotyp. Jedinou výjimkou je HH signalizace, která podporuje diferenciaci v NB při aktivaci. (Souzaki 2010)



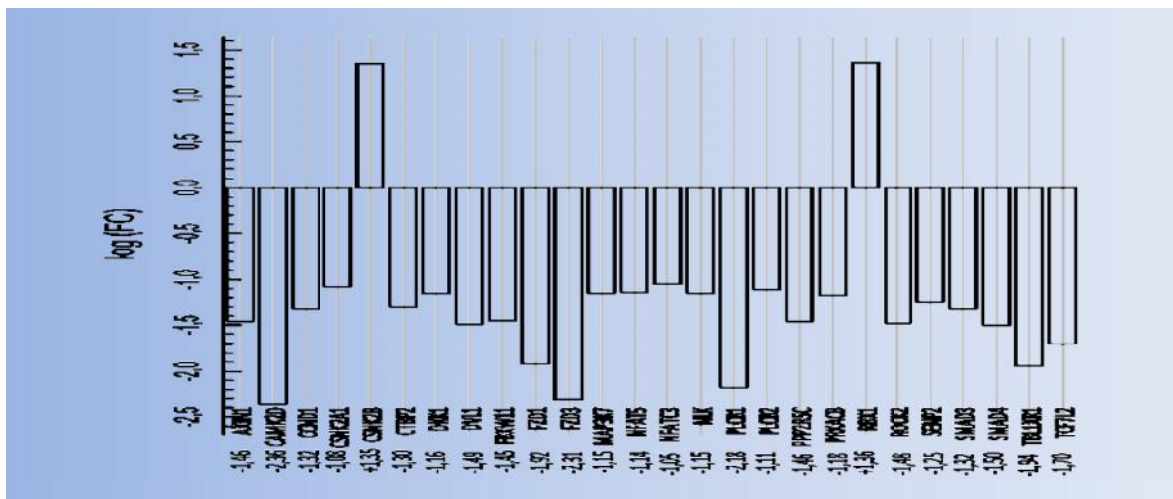
Obrázek 25 – Rozdílná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií. Produkty těchto genů se účastní NOTCH signalizace.



Obrázek 26 – Rozdílná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií. Produkty těchto genů se účastní „Hedgehog“ signalizace.



Obrázek 27 – Rozdílná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií. Produkty těchto genů se účastní TGF-β signalizace.



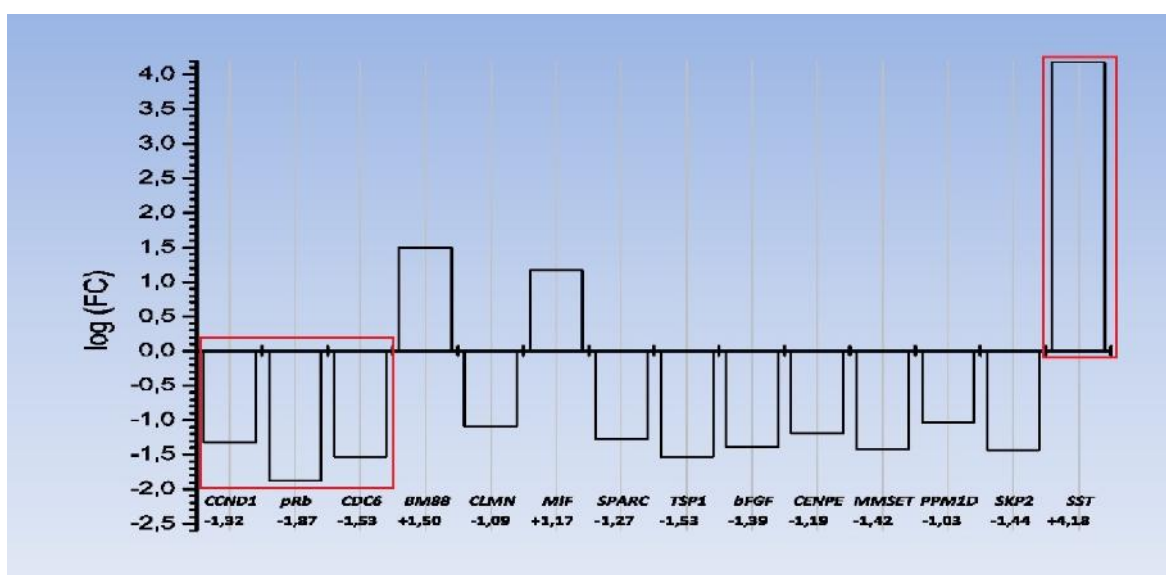
Obrázek 28 – Rozdílná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií. Produkty těchto genů se účastní Wnt-β-katenin signalizace.



### 3.6. ZMĚNY V EXPRESI GENŮ OVLIVŇUJÍCÍCH BUNĚČNÝ CYKLUS A PROLIFERACI V LINII UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> VE SROVNÁNÍ S PARENTÁLNÍ LINIÍ

V linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin dochází ke změnám v expresi genů ovlivňujících buněčný cyklus a proliferaci ve srovnání s parentální linií UKF-NB-4.

V neuroblastomové linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> byly pozorovány zásadní změny exprese **cyklinu D1** (CCND1), **retinoblastomového proteinu** (pRb) a **CDC6** (*cell division cycle 6*). V porovnání s parentální linií byly exprese těchto proteinů sníženy. (obr. 29) Cyklin D1 je nepříznivým prognostickým faktorem neuroblastomu a jeho exprese bývá v neuroblastomech zvýšena. Umožňuje buňce vstup z G<sub>1</sub> do S fáze a v komplexu s cyklin dependentní kinasou fosforyluje retinoblastomový protein. (Georgopoulou 2006 a Molenaar 2008) Exprese CDC6 je také obecně v neuroblastomech zvýšena, protože hraje zásadní roli při iniciaci replikace. (Feng 2008) Exprese těchto proteinů je regulována BM88 a kalminem (CLMN), které snižují expresi cyklinu D1 a zvyšují hladinu nefosforylovaného retinoblastomového proteinu, čímž zastavují buněčný cyklus a stimulují diferenciaci buňky. (Politis 2008 a Marzinke 2012) V NB linii rezistentní na ellipticin byla dále pozorována snížená exprese (v porovnání s parentální linií) u proteinů **inhibujících buněčný růst**. (obr. 29) Patří mezi ně osteonektin (SPARC) (Chlenski 2002), trombospondin (TSP1) (Yang 2003) a růstový faktor fibroblastů (bFGF). (Smits 2000)



Obrázek 29 – Změněná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin v porovnání s parentální linií UKF-NB-4, jejichž produkty ovlivňují buněčný cyklus a proliferaci.

Snížená exprese v rezistentní linii na ellipticin proti parentální linii UKF-NB-4 byla pozorována u proteinů, které **stimulují proliferaci** a zvyšují tedy i agresivitu nádoru. (obr. 29, str. 48) Mezi ně patří histon (lysin)methyltransferasa (MMSET) (Hudlebusch 2011), PPM1D (Saito-Ohara 2003), SKP2 (Muth 2010) a centromerový protein E (CENPE) (Balamuth 2010). **MIF** stimuluje v NB proliferaci (Ren 2006) a jeho exprese je v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> naopak zvýšena.

**Wnt-β-katenin** signalizace zajišťuje rychlejší přechod buněk z G<sub>1</sub> do S fáze buněčného cyklu a hraje zásadní roli v předmigračním vývoji neurální lišty. (Tringali 2012 a Koppen 2007) Exprese genů této signalizace je v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> oproti parentální linii snížena. (viz kap. 3.5.)

Významná je také zvýšená exprese peptidového hormonu **somatostatinu** v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií. (obr. 29, str. 48) Neuroblastomy vysokého rizika (*high risk neuroblastoma*) totiž somatostatin neprodukují. (Georgantzi 2011)

Funkce všech proteinů v regulaci buněčného cyklu a proliferace zmíněných v této kapitole byla popsána v různých typech neuroblastomů. (tab. 7) V linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> podle uvedených expresních dat tedy dochází k deregulaci exprese proteinů ovlivňujících buněčný cyklus, ke snížení exprese proteinů inhibujících proliferaci, ale také ke snížení exprese proteinů stimulujících buněčný růst. Velmi příznivé je, že v rezistentní linii dochází oproti parentální linii ke zvýšení exprese somatostatinu, změněná exprese

**Tabulka 7 – Geny, kódující proteiny, které mají vliv na buněčný cyklus a proliferaci v NB. V druhém sloupci jsou popsány buněčné linie/nádory neuroblastomu, kde tato spojitost byla popsána. Reference jsou popsány v textu u každého příslušného genu.**

somatostatinových receptorů však nebyla detekována.

	buněčná linie/nádory
<i>bFGF</i>	SK-N-MC
<i>BM88</i>	Neuro2a
<i>CCND1</i>	88 pacientů s neuroblastomem
<i>CDC6</i>	LA-N-2, CHLA255
<i>CENPE</i>	SK-N-AS, NGP
<i>CLMN</i>	Neuro2a
<i>MIF</i>	SK-N-DZ, Neuro2a
<i>MMSET</i>	SH-SY5Y, SK-N-BE2
<i>PPM1D</i>	32 neuroblastomů z pacientů
<i>pRb</i>	88 pacientů s neuroblastomem
<i>SKP2</i>	SK-N-SH, SH-EP, IMR-32, IMR5-75, Kelly, SH-SY5Y, BE(2)-C, SH-EP-E2F1, Tet21N
<i>SPARC</i>	SMS-KCNR, NBL-S, NBL-W-N, NBL-W-S, LA1-55N, LA1-5S, SH-SY5Y, SH-EP
<i>TSP1</i>	SK-N-SH, SMS-KCNR, NMB, IMR-5, NBL-S, SK-N-BE(1), SK-N-BE(2), NGP, NBL-W-N, NBL-W-S, LA1-55n, LA1-5s, SH-SY5Y, SH-EP
<i>SST</i>	11 pacientů klinických stádií II-IV

### 3.7. ZMĚNY EXPRESE GENŮ REGULUJÍCÍCH ANGIOGENEZI A METASTÁZOVÁNÍ V LINII UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> VE SROVNÁNÍ S PARENTÁLNÍ LINIÍ

Procesy angiogeneze, invazivita a metastázování, které přispívají k šíření nádoru, jsou typickým znakem pokročilých maligních nádorů. (Klener 2010) Lidská neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-4 byla založena z metastáz v kostní dřeni, jedná se tedy o velmi agresivní nádorovou linii. (Poljaková 2009) Při vývoji rezistence na ellipticin v linii UKF-NB-4 došlo ke změně v expresi mnoha genů, které ovlivňují výše zmíněné procesy.

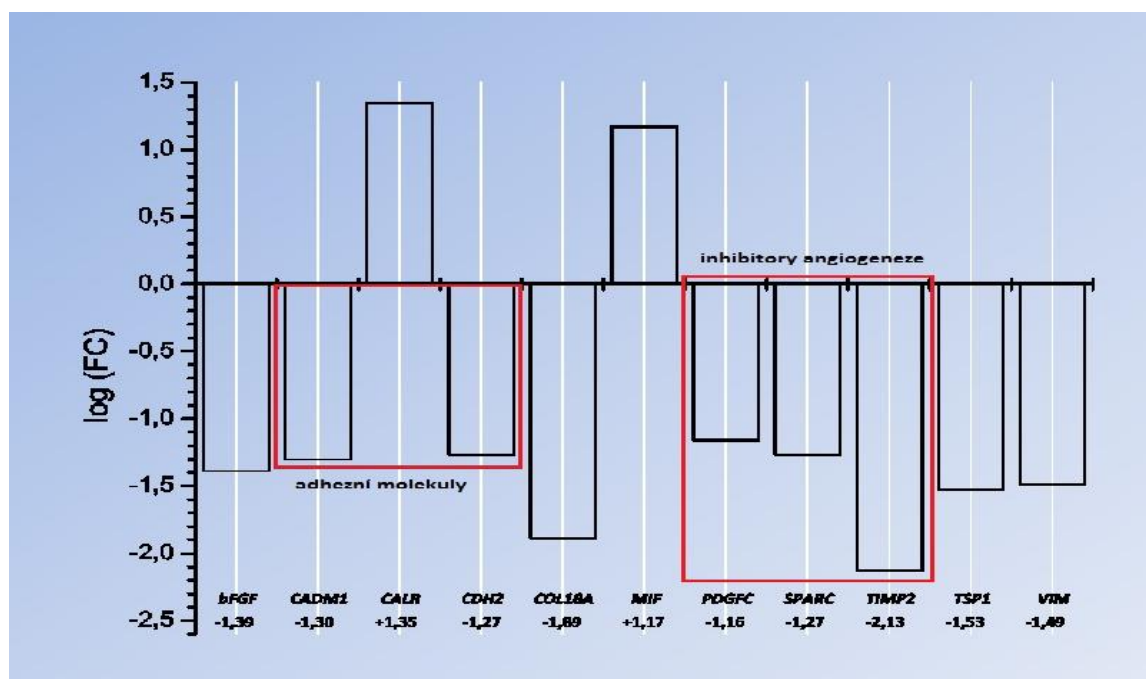
V NB linii rezistentní na ellipticin v porovnání s parentální linií je pozorována snížená exprese inhibitorů **angiogeneze** (obr. 30, str. 51) trombospondinu (TSP1) (Yang 2003), osteonektinu (SPARC) (Chlenski 2002), tkáňového inhibitoru metaloproteasy 2 (TIMP2) a kolagenu XVIII (COL18A), jehož štěpným produktem je endostatin. (Klener 2012) Významná je zvláště snížená exprese TSP1, který patří mezi nejdéle známé přirozené inhibitory angiogeneze, a jeho funkce byla potvrzena i v liniích neuroblastomu. (Yang 2003) Zvýšenou expresi v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči UKF-NB-4 má naopak proangiogenní faktor NB MIF. (Ren 2004) (obr. 30, str. 51) Při vývoji rezistence tedy došlo k podpoře angiogeneze snížením exprese antiangiogenních faktorů a zvýšením exprese **MIF** v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií. V rezistentní linii ale také dochází k narušení mechanismů funkčního dozrávání cév. Kalretikulín, který má zvýšenou expresi v rezistentní vůči parentální linii UKF-NB-4 (obr. 30, str. 51), inhibuje růst buněk endotelu (Hsu 2005) a naopak snížená exprese proangiogenních faktorů (obr. 30, str. 51), mezi které patří bazický růstový faktor pro fibroblasty (bFGF) nebo růstový faktor PDGFC, narušuje integritu cév. (Klener 2010) Buňky linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> jsou tedy schopné tvořit *de novo* velmi nevyzrálé cévy, takže populace nádorových neuroblastomových buněk bude při vývoji rezistence na ellipticin v hypoxických podmínkách. Buňky UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> mají na druhou stranu lepší příležitost k **invazi** porušeným endotelem kapilár do krevního řečiště a k **metastázování** v okolních tkáních.

Jedním z prvních a nejdůležitějších kroků metastatické kaskády je ztráta mezibuněčné interakce a interakce buňka-ECM. (Lammens 2012) Již v práci Procházký a kol. byla prokázána snížená exprese neuronální molekuly buněčné adheze (**NCAM/CD56**) v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči UKF-NB-4, což podporuje metastázování a transendoteliální penetraci. (Procházký 2012) Podle „microarray“ profilu je v rezistentní linii ve srovnání s parentální linií

snížená exprese další molekuly buněčné adheze (**CADM1**) (obr. 30), která právě při nízké expresi zvyšuje invazivitu neuroblastomů (Michels 2008), a **N-kadherin** (CDH2). (obr. 30) Obecně je exprese CDH2 spojována s malignějším fenotypem nádorů, ale nedávno bylo publikováno, že naopak exprese CDH2 v NB znamená lepší prognózu. Snížená exprese CDH2 je pozorována u pacientů s NB s metastázami. (Lammens 2012) Znovu je třeba na tomto místě zmínit protein **MIF**, který zvyšuje metastatický potenciál u neuroblastomů (Ren 2006) a jeho exprese je v linii rezistentní k ellipticinu zvýšena. (obr. 30) Po ztrátě buněčné adheze projde buňka přeměnou EMT. Expresí **mezenchymálního markeru vimentinu** (VIM) (Klener 2010) je však v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin vůči UKF-NB-4 snížena. (obr. 30) V tabulce 8 jsou zmíněny geny, jejichž funkce v angiogenezi a metastázování již byla popsána v neuroblastomech.

**Tabulka 8 – Geny, kódující proteiny, které mají vliv angiogenezi a metastázování v NB. V druhém sloupci jsou popsány buněčné linie/nádory neuroblastomu, kde tato spojitost byla popsána. Reference jsou popsány v textu u každého příslušného genu.**

	buněčné linie/nádory
<b>CADM1</b>	CHP-134, CHP-901, CLB-GA, GI-C-IN-1, LA-N-1, LA-N-5, NB-13, NB-19,N206, NBL-S, NGP, NLF, SHEP, SJNB-1, SJNB-6, SJNB-8, SJNB-10, SJNB-1.2, SK-N-AS, SKN-BE (1n), SK-N-BE (2c), SK-N-FI, SMS-KAN, SMS-KCNR, STA-NB-3, STA-NB-8, STA-NB-9, STA-NB-10, STA-NB-1.2, TR-14, UHG-NP
<b>CALR</b>	68 pacientů s neuroblastomem
<b>CDH2</b>	10 buněčných linií a 356 pacientů s neuroblastomem
<b>MIF</b>	SK-N-DZ, SK-N-SH
<b>SPARC</b>	SMS-KCNR, NBL-S, NBL-W-N, NBL-W-S, LA1-55N, LA1-5S, SH-SY5Y, SH-EP
<b>TSP1</b>	SK-N-SH, SMS-KCNR, NMB, IMR-5, NBL-S, SK-N-BE(1), SK-N-BE(2), NGP, NBL-W-N, NBL-W-S, LA1-55n, LA1-5s, SH-SY5Y, SH-EP



**Obrázek 30 – Změněná exprese genů v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin oproti parentální linii, které kódují proteiny ovlivňující angiogenezi, invazivitu a metastázování.**

## 4. ZÁVĚR

Z těchto výsledků vyplývá, že rezistence vůči ellipticinu neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> je multifaktoriální. Je důležité poznamenat, že předkládaná expresní data se týkají úrovně transkriptu genu, tedy hladiny příslušné mRNA. Skutečná hladina proteinu v buňce se tak může signifikantně lišit. Dále se jedná o pozorování *in vitro*, takže nedochází k interakci s nádorovým mikroprostředím *in vivo*. Výsledky bakalářské práce tedy předkládají sice schematický, ale hlavně komplexní pohled na mechanismy rezistence na ellipticin v UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>. Jedná se především o tyto příčiny:

**Ellipticin není vylučován z buněk linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>, ale je transportován z jádra a sekvestrován v intracelulárních kompartmentech.**

Exprese ABC transportérů se v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s parentální linií UKF-NB-4 snížila, u P-gp dokonce 107x. Eflux ellipticinu z buněk linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> tedy není hlavní mechanismem rezistence. Dochází ale ke zvýšení exprese LRP, hlavní složky molekulárních „trezorů“, které mohou transportovat ellipticin z jádra, místa cytotoxického účinku. V cytoplasmě dochází k intracelulární kompartmentalizaci a sekvestraci ellipticinu také pomocí V-ATPas.

**Exprese enzymů metabolizujících ellipticin je v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči parentální linii UKF-NB-4 nezměněna. Exprese cytochromu b<sub>5</sub>, který zvyšuje cytotoxicitu ellipticinu, se ale zvýšila 22x.**

Hladina transkriptu (detekovaná metodou DNA „microarray“) cytochromů P450, peroxidas, sulfottransferas, N,O-acetyltransferas a POR zůstala v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s linií UKF-NB-4 nezměněna. Pomocí qRT-PCR však byla zaznamenána zvýšená exprese CYP3A4 a COX-1, které aktivují ellipticin na cytotoxické metabolity. Specifitu hydroxylace ellipticinu a jeho účinnost zvyšuje cytochrom b<sub>5</sub>. Velmi důležité je tedy zjištění, že v linii rezistentní na ellipticin UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> nedochází k potlačení enzymatické aktivace ellipticinu, který pak tvoří cytotoxické adukty s DNA. Ty ale mohou být vyštěpeny „excizními“ opravnými mechanismy. Exprese enzymů opravujících DNA pomocí NER a BER je v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči linii UKF-NB-4 zvýšená. S rezistencí na protinádorová léčiva je spojována hlavně poly(ADP-ribosa)polymerasa 1 (PARP1), jejíž exprese se zvýšila 10x.

**Expresse topoisomerasy II, jednoho z cílů cytotoxického účinku ellipticinu, se v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s linií UKF-NB-4 signifikantně snížila.**

Expresse topoisomerasy I (*TOP1*) se snížila 245x, *TOP2A* 100x a u *TOP2B* 19x. Snižuje se tedy účinnost ellipticinu jako inhibitoru topoisomerasy II. Pozitivní však je, že expresse enzymů opravujících dvojlátkové zlomy v DNA je v rezistentní linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> oproti linii UKF-NB-4 snížena. Stejně tak je snížena expresse enzymů (*ATM*, *ATR*), které upozorňují na genotoxický stres.

**Expresse protoonkogenu *MYCN* se v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči linii UKF-NB-4 sice snížila, při dlouhodobé kultivaci ellipticinu v linii UKF-NB-4 ale došlo k narušení zpětnovazebné autoregulace exprese *MYCN* a translokaci proteinu *MYCN* zpět do jádra.**

*MYCN* je nezávislý nepříznivý prognostický faktor neuroblastomů. Histondeacetylasa 2 (*HDAC2*), jejíž expresse v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> v porovnání s linií UKF-NB-4 je snížena, se podílí na represi exprese *MYCN*, pokud je hladina transkriptu *MYCN* zvýšena. Na druhou stranu při nízké hladině *HDAC* jsou histony acetylovány – a DNA je „odkryta“ pro reaktivní formy ellipticinu. Inhibiční faktor migrace makrofágů *MIF* nejen přemísťuje protein *MYCN* zpět do jádra, kde *MYCN* působí jako transkripční faktor, ale také indukuje expresi genu *MYCN*. Expresse *MIF* je v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči UKF-NB-4 zvýšena 15x.

**V neuroblastomové linii rezistentní na ellipticin UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> dochází ke snížení apoptózy indukované ellipticinem a ke snížení proliferace. Zároveň buňky linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> částečně diferencují.**

Především se jedná o zvýšenou hladinu antiapoptických proteinů *Bcl-2* a *BAG1* v linii rezistentní (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>) oproti parentální (UKF-NB-4) a také o zvýšenou expresi superoxidodismutasy (19x) a peroxiredoxinu (19x), hlavních antioxidantů v mitochondriích. Proliferace je potlačena sníženou expresí cyklinu *D1* (21x) a *CDC6* (34x) v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> vůči linii UKF-NB-4 a zvýšenou expresí hormonu somatostatinu – (15136x), čímž buňky neuroblastomu získávají prostor pro diferenciaci, což je prokázáno nejen růstem neuritů a expresí neurodiferenčních markerů, ale i sníženou expresí genů, které kódují proteiny signalizací *NOTCH*, *WNT*- $\beta$ -katenin a *TGF $\beta$* .

### **Nízké intracelulární pH v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> snižuje cytotoxicitu ellipticinu.**

Již vyšlo mnoho prací o duální fluorescenci ellipticinu v závislosti na tom, jestli je ellipticin na dusíku N(2) protonován. S tím souvisí cytotoxické mechanismy účinku ellipticinu. Při nízkém intracelulárním pH se ellipticin stává permanentním kationtem jako např. ellipticinium, který je methylován právě v poloze N(2). S nízkým pH klesá schopnost ellipticinu tvořit adukty s DNA, odpřahovat oxidativní fosforylaci v mitochondriích a na schopnosti ellipticinu tvořit neutrální formu a formu kationtu je pravděpodobně založena i interakce ellipticinu s topoisomerasou II. O nízkém pH v linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> svědčí nepřímé důkazy – jako je 105x snížená exprese *MCT1* a zvýšená exprese *LDHB/C* v porovnání s parentální linií UKF-NB-4.

### **Linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> rezistentní na ellipticin indukuje angiogenezi, je více invazivní a má vyšší metastatický potenciál než parentální linie UKF-NB-4.**

Angiogeneze a metastázování jsou potenciovány již zmíněným proteinem MIF. V linii UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> oproti linii UKF-NB-4 zároveň dochází ke snížení exprese inhibitorů angiogeneze (*TSP1*, *TIMP2*, *COL18A*) a narušení mechanismů funkčního dozrávání cév. Metastatický potenciál buněk linie UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> je posílen sníženou expresí adhezivních molekul v porovnání s parentální linií UKF-NB-4 (*NCAM/CD56*, *CADM1* a *N-kadherin*).

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Ambion Inc.: **MessageAmp™ aRNA Kit, RNA Amplification for Array Analysis**, ke stažení z <http://www.genome-explorations.com/> [CIT 1.2.2012] (2002)
2. Ambros I.M., Zellner A., Roald B., Amann G., Ladenstein R., Printz D., Gadner H., Ambros P.F.: **Role of Ploidy, Chromosome 1p, and Schwann Cells in the Maturation of Neuroblastoma**, *N. Engl. J. Med.* **334**, 1505-1511 (1996)
3. Auclair C., **Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series**, *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 1–14 (1987)
4. Barth B.M., Gustafson S.J., Hankins J.L., Kaiser J.M., Haakenson J.K., Kester M., Kuhn T.B.: **Ceramide kinase regulates TNF $\alpha$ -stimulated NADPH oxidase activity and eicosanoid biosynthesis in neuroblastoma cells**, *Cell. Signalling* **24**, 1126–1133 (2012)
5. Beierle E.A., Trujillo A., Nagaram A., Kurenova E.V., Finch R., Ma X., Vella J., Cance W.G., Golubovskaya V. M.: **N-MYC Regulates Focal Adhesion Kinase Expression in Human Neuroblastoma**, *J. Biol. Chem.* **282**, 12503-12516 (2007)
6. Bollimunthaa S., Ebadib M., Singha B.B.: **TRPC1 protects human SH-SY5Y cells against salsolinol-induced cytotoxicity by inhibiting apoptosis**, *Brain Res.* **1099**, 141–149 (2006)
7. Brodeur G.M.: **Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma.**, *Nat. Rev. Cancer* **3**, 203-216 (2003)
8. Broudeur G.M., Sawada T., Tsuchida Y., Voute P.A.: **Neuroblastoma**, Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo (2000)
9. Cecere F., Iuliano A., Albano F., Zappelli C., Castellano I., Grimaldi P., Masullo M., De Vendittis E., Ruocco M.R.: **Diclofenac-Induced Apoptosis in the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: Possible Involvement of the Mitochondrial Superoxide Dismutase**, *J. Biomed Biotechnol.* **2010**, 801726 [Epub] (2010)
10. Ciasque P., Thomas A., Fontaine M., Morgan B.P.: **Complement activation on human neuroblastoma cell lines in vitro: route of activation and expression of functional complement regulatory proteins**, *J. Neuroimmunol.* **66**, 29-40 (1996)
11. Davidoff A.M.: **Neuroblastoma**, *Semin. Pediatr. Surg.* **21**, 2-14 (2012)
12. De Cremoux P., Jourdan-Da-Silva N., Couturier J., Tran-Perennou C., Schleiermacher G., Fehlbaum P., Doz F., Mosseri V., Delattre O., Klijanienko J., Vielh P., Michon J.: **Role of Chemotherapy Resistance Genes in Outcome of Neuroblastoma**, *Pediatr. Blood Cancer* **48**, 311–317 (2007)
13. De Simoni S., Goemaere J., Knoops B.: **Silencing of peroxiredoxin 3 and peroxiredoxin 5 reveals the role of mitochondrial peroxiredoxins in the protection of human neuroblastoma SH-SY5Y cells toward MPP+**, *Neurosci. Lett.* **433**, 219–224 (2008)
14. Dohm C.P., Siedenberg S., Liman J., Esposito A., Wouters F.S., Reed J.C., Bähr M., Kermer P.: **Bax Inhibitor-1 Protects Neurons From Oxygen-Glucose Deprivation**, *J. Mol. Neurosci.* **29**, 1-8 (2006)
15. Ejeskär K., Abel F., Sjöberg R.M., Bäckström J., Kogner P., Martinsson T.: **Fine mapping of the human preprocortistatin gene (CORT) to neuroblastoma consensus deletion region 1p36.3→p36.2, but absence of mutations in primary tumors**, *Cytogenet. Cell. Genet.* **89**, 62–66 (2000)
16. Fan J., Chen Y., Chan H.M., Tam P.K.H., Ren Y.: **Removing intensity effects and identifying significant genes for Affymetrix arrays in macrophage migration inhibitory factor-suppressed neuroblastoma cells**, *PNAS* **102**, 17751-17756 (2005)
17. Fang J., Quinones Q.J., Holman T.L., Morowitz M.J., Wang Q., Zhao H., Sivo F., Maris J.M., Wahl M.L.: **The H<sup>+</sup>-Linked Monocarboxylate Transporter (MCT1/SLC16A1): A Potential Therapeutic Target for High-Risk Neuroblastoma**, *Mol. Pharmacol.* **70**, 2108–2115 (2006)
18. Feng L., Barnhart J.R., Seeger R.C., Wu L., Keshelava N., Huang S.H., Jong A.: **Cdc6 knockdown inhibits human neuroblastoma cell proliferation**, *Mol. Cell. Biochem.* **311**, 189–197 (2008)
19. Froelich-Ammon S.J., Patchan M.W., Osheroff N., Thompson R.B.: **Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy**, *J. Biol. Chem.* **270**, 14998-5004 (1996)
20. Fujimuraa L., Watanabe-Takanoa H., Satob Y., Tokuhisab T., Hatanoa M.: **Prickle promotes neurite outgrowth via the Dishevelled dependent pathway in C1300 cells**, *Neurosci. Lett.* **467**, 6-10 (2009)



21. Georgantzi K., Tsolakis A.V., Stridsberg M., Jakobson A., Christofferson R., Janson E.T.: **Differentiated Expression of Somatostatin Receptor Subtypes in Experimental Models and Clinical Neuroblastoma**, *Pediatr. Blood Cancer* 56, 584–589 (2011)
22. Georgopoulou N., Hurel C., Politis P.K., Gaitanou M., Matsas R., Thomaidou D.: **BM88 Is a Dual Function Molecule Inducing Cell Cycle Exit and Neuronal Differentiation of Neuroblastoma Cells via Cyclin D1 Down-regulation and Retinoblastoma Protein Hypophosphorylation**, *J. Biol. Chem.* 281, 33606-22620 (2006)
23. Goodman M.T., Gurney J.G., Smith M.A., Olshan A., **Sympathetic nervous system tumors**, SEER Pediatric Monograph, National Cancer Institute (2008)
24. Goodwin S., Smith A.F., Horning E.C.: **Alkaloids of Ochrosia elliptica Labill** *J. Am. Chem. Soc.* 81, 1903-1908 (1959)
25. Hanahan D., Weinberg R.A.: **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**, *Cell* 144, 646-674 (2011)
26. Hanahan D., Weinberg R.A.: **The Hallmarks of Cancer**, *Cell* 100, 57-70 (2000)
27. Haque N., Gong C.X., Sengupta A., Iqbal K., Grundke-Iqbal I.: **Regulation of microtubule-associated proteins, protein kinases and protein phosphatases during differentiation of SY5Y cells**, *Brain Res.* 129, 163-70 (2004)
28. Haug L.S., Walaas S.I., Østfold A.C.: **Degradation of the Type I Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor by Caspase-3 in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Undergoing Apoptosis**, *J Neurochem.* 75, 1852-1861 (2000)
29. Heck J.E., Ritz B., Hung R.J., Hashibe M., Boffetta P.: **The epidemiology of neuroblastoma: a review**, *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 23, 125-143 (2009)
30. Heller M.J.: **DNA microarray technology: devices, systems, and applications**, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4, 129-153 (2002)
31. Henderson M.J., Haber M., Porro A., Munoz M.A., Iraci N., Xue C., Murray J., Flemming C.L., Smith J., Fletcher J.I., Gherardi S., Kwek C.K., Russell A.J., Valli E., London W.B., Buxton A.B., Ashton L.J., Sartorelli A.C., Cohn S.L., Schwab M., Marshall G.M., Perini G., Norrism M.D.: **ABCC Multidrug Transporters in Childhood Neuroblastoma: Clinical and Biological Effects Independent of Cytotoxic Drug Efflux**, *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1236-1251 (2011)
32. Hraběta J., Poljaková J., Uhlík J., Stiborová M., Eckschlager T.: **Intracellular sequestration of ellipticine: Role of vacuolar ATPASE**, 6. Konference Analytická cytometrie, Praha, Česká republika, č. abstr. 33 (2011)
33. Hsu W. M., Hsieh F. J., Jeng Y. M., Kuo M. L., Chen C. N., Lai D. M., Hsieh L. J., Wang B. T., Tsao P. N., Lee H., Lin M. T., Lai H. S., Chen W. J.: **Calreticulin expression in neuroblastoma—a novel independent prognostic factor**, *Ann. Oncol.* 16, 314-321 (2005)
34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> [cit. 15.4.2012]
35. Hudlebusch H.R., Skotte J., Santoni-Rugiu E., Zimling Z.G., Lees M.J., Simon R., Sauter G., Rota R., De Ioris M.A., Quarto M., Johansen J.V., Jørgensen M., Rechnitzer C., Maroun L.L., Schröder H., Petersen B.L., Helin K.: **MMSET Is Highly Expressed and Associated with Aggressiveness in Neuroblastoma**, *Cancer Res.* 71, 4226-4235 (2011)
36. Hyun D.H., Kim J., Moon C., Lim C.J., De Cabo R., Mattson M.P.: **The plasma membrane redox enzyme NQO1 sustains cellular energetics and protects human neuroblastoma cells against metabolic and proteotoxic stress**, *AGE* 34, 359–370 (2012)
37. Chakravarthy B.R., Walker T., Rasquinha I., Hill I.E., MacManus J.P.: **Activation of DNA-Dependent Protein Kinase May Play a Role in Apoptosis of Human Neuroblastoma Cells**, *J. Neurochem.* 72, 933-942 (1999)
38. Chang H.H., Lee H., Hu M.K., Tsao P.N., Juan H.F., Huang M.C., Shih Y.Y., Wang B.J., Jeng Y.M., Chang C.L., Huang S.F., Tsay Y.G., Hsieh F.J., Lin K.H., Hsu W.M., Liao Y.F.: **Notch1 Expression Predicts an Unfavorable Prognosis and Serves as a Therapeutic Target of Patients with Neuroblastoma**, *Clin. Cancer Res.* 16, 4411-4420 (2010)
39. Chetsawanga J., Suwanjangb W., Pirompuls N., Govitrapongb P., Chetsawangb B.: **Calpastatin reduces methamphetamine-induced induction in c-Jun phosphorylation, Bax and cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells**, *Neurosci. Lett.* 506, 7– 11 (2012)
40. Chlenski A., Liu S., Crawford S.E., Volpert O.V., De Vries G.H., Evangelista A., Yang Q., Salwen H.R., Farrer R., Bray J., Cohn S.L.: **SPARC Is a Key Schwannian-derived Inhibitor Controlling Neuroblastoma Tumor Angiogenesis**, *Cancer Res.* 62, 7357-7363 (2002)
41. Jankowski M.P., Cornuet P.K., McIlwrath S., Koerber H.R., Albers K.M.: **SRY-Box Containing Gene 11 (Sox11) Transcription Factor Is Required for Neuron Survival and Neurite Growth**, *Neurosci. Lett.* 143, 501–514 (2006)

42. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D.: **Global Cancer Statistics**, CA Cancer J. Clin. 61, 69-90 (2011)
43. Judson H., Van Roy N., Vandesompele L.S.J., Van Gele M., Speleman F., Bonthron D.T.: **Structure and mutation analysis of the gene encoding DNA fragmentation factor 40 (caspase-activated nuclease), a candidate neuroblastoma tumour suppressor gene**, Hum. Genet. 106, 406–413 (2000)
44. Kaneko S., Ohira M., Nakamura Y., Isogai E., Nakagawara A., Kaneko M.: **Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma**, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 133, 185–192 (2007)
45. Kim J.Y., Lee S.G., Chung J.Y., Kim Y.J., Park J.E., Koh H., Han M.S., Park Y.C., Yoo Y.H., Kim J.M.: **Ellipticine induces apoptosis in human endometrial cancer cells: the potential involvement of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases**, Toxicol. 289, 91-102 (2011)
46. Kim M.K.H., Carroll W.L.: **Autoregulation of the N-myc Gene Is Operative in Neuroblastoma and Involves Histone Deacetylase 2**, Cancer Lett. 101, 2106-15 (2004)
47. Klener P., Klener Jr. P.: **Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii**, GRADA Publishing, Praha (2010)
48. Koolman J., Roehm K.H.: **Color Atlas of Biochemistry**, 2nd edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2005)
49. Koppen A., Ait-Aissa R., Hopman S., Koster J., Haneveld F., Versteeg R., Valentijn L.J.: **Dickkopf-1 is down-regulated by MYCN and inhibits neuroblastoma cell proliferation**, Cancer Lett. 256, 218–228 (2007)
50. Kotrbová V., Mrázová B., Moserová M., Martínek V., Hodek P., Hudeček J., Frei E., Stiborová M.: **Cytochrome b5 shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy**, Biochem. Pharmacol. 82, 669-680 (2011)
51. Koutecký J.: **Klinická onkologie I.**, Riopress, Praha (2004)
52. Kuo P.L., Hsu Y.L., Chang CH., Lin C.C.: **The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells**, Cancer Lett. 223, 293-301 (2005)
53. Kuo Y.C., Kuo P.L., Hsu Y.L., Cho C.Y., Lin C.C.: **Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells**, Life Sci. 78, 2550-2557 (2006)
54. Lahousse S.A., Carter J.J., Xu X.J., Wands J.R., de la Monte S.M.: **Differential growth factor regulation of aspartyl-(asparaginy)-beta-hydroxylase family genes in SH-Sy5y human neuroblastoma cells**, BMC Cell Biol. 7, 41 (2006)
55. Lammens T., Swerts K., Derycke L., De Craemer A., De Brouwer S., De Preter K., Van Roy N., Vandesompele J., Speleman F., Philippé J., Benoit Y., Beiske K., Bracke M., Laureys G.: **N-Cadherin in Neuroblastoma Disease: Expression and Clinical Significance**, Plos One 7, e31206 [Epub] (2012)
56. Lee M.L.T.: **Analysis of Microarray gene expression data**, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow (2004)
57. Leone A., Mitsiades N., Ward Y., Spinelli B., Poulaki V., Tsokos M., Kelly K.: **The Gem GTP-binding protein promotes morphological differentiation in neuroblastoma**, Oncogene 20, 3217-25 (2001)
58. Li X., Gu W., Mohan S., Baylink D.J.: **DNA microarray: Their Use and Misuse**, Microcirc. 9, 13-22 (2002)
59. Lin R.J., Lin Y.C., Chen J., Kuo H.H., Chen Y.Y., Diccianni M.B., London W.B., Chang C.H. Yu A.L.: **microRNA Signature and Expression of Dicer and Drosha Can Predict Prognosis and Delineate Risk Groups in Neuroblastoma**, Cancer Res. 70, 7841-7850 (2010)
60. Malentacchi F., Marzocchini R., Gelmini S., Orlando C., Serio M., Ramponi G., Raugéi G.: **Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatases in different human cancers**, Biochem. Biophys. Res. Commun. 334, 875-883 (2005)
61. Maris J.M., Matthay K.K.: **Molecular biology of neuroblastoma**, J. Clin. Oncol. 17, 2264-2279 (1999)
62. Marzinke M.A., Clagett-Dame M.: **The all-trans retinoic acid (atRA)-regulated gene Calmin (Clmn) regulates cell cycle exit and neurite outgrowth in murine neuroblastoma (Neuro2a) cells**, Exp. Cell Res. 318, 85-93 (2012)
63. Mazánek P., Bajčiova V., Šterba J., Kuglik P., Veselska R.: **Novinky v diagnostice a léčbě neuroblastomu**, Onkologia (Bratisl.) 4, 257–261 (2008)
64. Michels E., Hoebeek J., De Preter K., Schramm A., Brichard B., De Paepe A., Eggert A., Laureys G., Vandesompele J., Speleman F.: **CADM1 is a strong neuroblastoma candidate gene that maps within a 3.72 Mb critical region of loss on 11q23**, BMC Cancer 8, 173 [Epub] (2008)

65. Molenaar J.J., Ebus M.E., Koster J., Van Sluis P., Van Noesel C.J.M., Versteeg R., Caron H.N.: **Cyclin D1 and CDK4 Activity Contribute to the Undifferentiated Phenotype in Neuroblastoma**, *Cancer Res.* 68, 2599-2609 (2008)
66. Moore K.L., Persaud T. V. N.: **Zrození člověka**, 1. vyd., ISV, Praha (2002)
67. Mossink M.H., van Zon A., Scheper R.J., Sonneveld P., Wiemer E.A.C.: **Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance?**, *Oncogene* 22, 7458–7467 (2003)
68. Murakami M., Ito H., Hagiwara K., Yoshida K., Sobue S., Ichihara M., Takagi A., Kojima T., Tanaka K., Tamiya-Koizumi K., Kyogashima M., Suzuki M., Banno Y., Nozawa Y., Murate T.: **ATRA inhibits ceramide kinase transcription in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells: the role of COUP-TFI**, *J. Neurochem.* 112, 511-520 (2010)
69. Muth D., Ghazaryan S., Eckerle I., Beckett E., Pöhler C., Batzler J., Beisel C., Gogolin S., Fischer M., Henrich K.O., Ehemann V., Gillespie P., Schwab M., Westermann F.: **Transcriptional Repression of SKP2 Is Impaired in MYCN Amplified Neuroblastoma**, *Cancer Res.* 70, 3791-3802 (2010)
70. Nature Protocols 2009, 4(1):44 and *Nucleic Acids Res.* 2009, 27(1):1
71. Norris M.D., Smith J., Tanabe K., Tobin P., Flemming C., Scheffer G.L., Wielinga P., Cohn S.L., London W.B., Marshall G.M., Allen J.D., Haber M.: **Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro**, *Mol. Cancer Ther.* 4, 547-553 (2005)
72. Nowacki S., Skowron M., Oberthuer A., Fagin A., Voth H., Brors B., Westermann F., Eggert A., Hero B., Berthold F., Fischer M.: **Expression of the tumour suppressor gene CADM1 is associated with favourable outcome and inhibits cell survival in neuroblastoma**, *Oncogene* 27, 3329-38 (2008)
73. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N.: **Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism**, *Jpn. J. Cancer Res.* 86, 819-827 (1995)
74. Politis P.K., Akrivou S., Hurel C., Papadodima O., Matsas R.: **BM88/Cend1 is involved in histone deacetylase inhibition-mediated growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells**, *FEBS Lett.* 582, 741-748 (2008)
75. Poljaková J., Eckschlager T., Hřebečková J., Hraběta J., Stiborová M.: **The Comparison of cytotoxicity of the anticancer drugs doxorubicin and ellipticine to human neuroblastoma cells**, *Interdisc. Toxicol.* 1, 186-189 (2008)
76. Poljaková J., Eckschlager T., Hrabeta J., Hřebečková J., Smutný S., Frei E., Martínek V., Kizek R., Stiborová M.: **The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells**, *Biochem. Pharmacol.* 77, 1466-1479 (2009)
77. Procházka P., Poljaková J., Vícha A., Stiborová M., Eckschlager T.: **Genetic changes of high-risk neuroblastoma cell line mediated by cultivation with ellipticine**, poster, Přírodovědecká fakulta a 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze (2007)
78. Procházka P., Libra A., Zemanová Z., Hřebečková J., Poljaková J., Hraběta J., Bunčec M., Stiborová M., Eckschlager T.: **Mechanisms of ellipticine-mediated resistance in UKF-NB-4 neuroblastoma cells**, *Cancer Sci.* 103, 334-341 (2012)
79. Ren Y., Chan H.M., Fan J., Xie Y., Chen Y.X., Li W., Jiang G.P., Liu Q., Meinhardt A., Tam P.K.H. : **Inhibition of tumor growth and metastasis in vitro and in vivo by targeting macrophage migration inhibitory factor in human neuroblastoma**, *Oncogene* 25, 3501–3508 (2006)
80. Ren Y., Chan H.M., Li Z., Lin C., Nicholls J., Chen C.F., Lee P.Y., Lui V., Bacher M., Tam P.K.H.: **Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced N-Myc expression by the activation of ERK signaling pathway and increased expression of interleukin-8 and VEGF in neuroblastoma**, *Oncogene* 23, 4146–4154 (2004)
81. Ruan Q., Harrington A.J., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Standaert D.G.: **VPS41, a protein involved in lysosomal trafficking, is protective in C. elegans and mammalian cellular models of Parkinson's disease**, *Neurobiol. Dis.* 37, 330 (2010)
82. Rudie H.A., Nahreini P., Andreatta C.P., Edwards-Prasad J., Prasad K.N.: **Identifying genes involved in regulating differentiation of neuroblastoma cells**, *J. Neurosci. Res.* 64, 302-10 (2001)
83. Saito-Ohara F., Imoto I., Inoue J., Hosoi H., Nakagawara A., Sugimoto T., Inazawa J.: **PPM1D Is a Potential Target for 17q Gain in Neuroblastoma**, *Cancer Res.* 63, 1876-1783 (2003)
84. Shahi M.H., Lorente A., Castresana J.S.: **Hedgehog signalling in medulloblastoma, glioblastoma and neuroblastoma**, *Oncol. Rep.* 19, 681-688 (2008)
85. Schenkman J.B., Jansson I.: **The many roles of cytochrome b5**, *Pharmacol. Ther.* 97, 139–152 (2003)

86. Schwaller M.A., Allard B., Lescot E., Moreau F., **Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria**, *J. Biol. Chem.* **270**, 22709-22713 (1995)
87. Smits V.A. J., Van Peer M.A., Essers M.A.G., Klompmaker R., Rijksen G., Medema R.H.: **Negative Growth Regulation of SK-N-MC Cells by bFGF Defines a Growth Factor-sensitive Point in G<sub>2</sub>**, *J. Biol. Chem.* **275**, 19375-19381 (2000)
88. Souzaki R., Tajiri T., Souzaki M., Kinoshita Y., Tanaka S., Kohashi K., Oda Y., Katana M., Taguchi T.: **Hedgehog signaling pathway in neuroblastoma differentiation**, *J. Pediatr. Surg.* **45**, 2299-304 (2010)
89. Spugnini E.P., Citro G., Fais S.: **Proton pump inhibitors as anti vacuolar-ATPases drugs: a novel anticancer strategy**, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **29**, 44 [Epub] (2010)
90. Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: **The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts**, *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1675-1684 (2001)
91. Stiborová M., Indra R., Moserová M., Černá V., Rupertová M., Martínek M., Eckschlager T., Kizek R., Frei E.: **Cytochrome b5 Increases Cytochrome P450 3A4-Mediated Activation of Anticancer Drug Ellipticine to 13-Hydroxyellipticine Whose Covalent Binding to DNA Is Elevated by Sulfotransferases and N,O-Acetyltransferases**, *Chem. Res. Toxicol.* [Epub] (2012)
92. Stiborová M., Poljaková J., Martínková E., Bořek-Dohalská L., Eckschlager T., Kizek R., Frei E.: **Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines – a comparative study**, *Interdiscip. Toxicol.* **4**, 98-105 (2011)
93. Stiborová M., Poljaková J., Ryšlavá H., Dračínský M., Eckschlager T., Frei E.: **Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine**, *Int. J. Cancer* **120**, 243–251 (2006)
94. Stiborová M., Rupertová M., Aimová D., Ryšlavá H., Frei E.: **Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats**, *Toxicology* **236**, 50-60 (2007)
95. Stiborová M., Sejbal J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: **The Anticancer Drug Ellipticine Forms Covalent DNA Adducts, Mediated by Human Cytochromes P450, through Metabolism to 13-Hydroxyellipticine and Ellipticine N2-Oxide**, *Cancer Res* **64**, 8374-8380 (2004a)
96. Stiborová M.: **Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace**, ke stažení z <http://archiv.otevrenaveda.cz> [cit. 1.2.2012] (2004b)
97. Suzuki K., Kobayashi T., Osamu F., Morita A., Ikekita M.: **Activin A induces neuronal differentiation and survival via ALK4 in a SMAD-independent manner in a subpopulation of human neuroblastomas**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 639-645 (2010)
98. Szebenyi G., Bollati F., Bisbal M., Sheridan S., Faas L., Wray R., Haferkamp S., Nguyen S., Caceres A., Brady S.T.: **Activity-Driven Dendritic Remodeling Requires Microtubule-Associated Protein 1A**, *Curr. Biol.* **15**, 1820-1826 (2005)
99. Thermo Fisher Scientific Inc., **NanoDrop 1000 Spectrophotometer, V3.7 User's Manual**, ke stažení z <http://www.nanodrop.com> [cit. 1.2.2012] (2008)
100. Tringali C., Cirillo F., Lamorte G., Papini N., Anastasia L., Lupo B., Silvestri I., Tettamanti G., Venerando B.: **NEU4L sialidase overexpression promotes b-catenin signaling in neuroblastoma cells, enhancing stem-like malignant cell growth**, *Int. J. Cancer.* [Epub] (2012)
101. Vitali R., Mancini C., Cesi V., Tanno B., Mancuso M.T., Bossi G., Zhang Y., Martinez R.V., Calabretta B., Dominici C., Raschella G.: **Slug (SNAI2) Down-Regulation by RNA Interference Facilitates Apoptosis and Inhibits Invasive Growth in Neuroblastoma Preclinical Models**, *Clin. Cancer Res.* **14**, 4622-4630 (2008)
102. Yana X., Orentasa R.J., Johnsona B.D.: **Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibits T lymphocyte activation**, *Cytokine* **33**, 188–198 (2006)
103. Yang Q., Liu S., Tian Y., Hasan C., Kersey D., Salwen H.R., Chlenski A., Perlman E.J., Cohn S.L.: **Methylation-Associated Silencing of the Heat Shock Protein 47 Gene in Human Neuroblastoma**, *Cancer Res.* **64**, 4531-4538. (2004)
104. Yang Q., Liu S., Tian Y., Salwen H.R., Chlenski A., Weinstein J., Cohn S.L.: **Methylation-associated Silencing of the Thrombospondin-1 Gene in Human Neuroblastoma**, *Cancer Res.* **63**, 6299-6310 (2003)
105. Zhao J., Liu Y., Wei X., Yuan C., Yuana X., Xiao X.: **A novel WD-40 repeat protein WDR26 suppresses H2O2-induced cell death in neural cells**, *Neurosci. Lett.* **460**, 66–71 (2009)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka